

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe  
(Direktor: Prof. Dr. med. Nicolai Maass)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

# ***CDH1*-Mutationen in Familien mit Mamma- und Magenkarzinomen**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Frederik Stübs  
aus Kappeln  
Kiel 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Norbert Arnold  
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
UKSH Campus Kiel  
Arnold-Heller-Straße 3  
24105 Kiel
  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Susanne Sebens  
Institut für Experimentelle Tumorforschung  
UKSH Campus Kiel  
Arnold-Heller-Straße 3  
24105 Kiel

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.07.2018

Gez.: Prof. Dr. Roider

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis .....	5
Abbildungsverzeichnis .....	6
Abkürzungsverzeichnis .....	7
1 Einleitung .....	8
1.1 Epidemiologie .....	8
1.2 Histologie .....	8
1.3 Klinik und Diagnostik .....	9
1.4 Therapie.....	10
1.5 Das lobuläre Mammakarzinom .....	11
1.6 Risikofaktoren .....	12
1.7 Genetische Risikofaktoren.....	14
1.8 CDH1 und E-Cadherin .....	15
1.9 Familiäres diffuses Magenkarzinomsyndrom .....	16
1.10 Zielsetzung der Arbeit .....	16
2 Materialien.....	18
2.1 Verbrauchte Chemikalien.....	18
2.2 Arbeitsgeräte .....	19
2.3 Verbrauchsutensilien .....	20
2.4 Software.....	20
3 Methoden.....	21
3.1 Messung der DNA-Konzentration und Reinheit .....	21
3.2 Primer Design.....	21
3.3 PCR (Polymerase chain reaction).....	23
3.4 PCR- Bedingungen.....	25
3.4.1 PCR-Bedingungen für Ex1, Ex2, Ex3, Ex4, Ex5, Ex6, Ex7, Ex8, Ex11, Ex12, Ex13.1, Ex14 und Ex15.....	25
3.4.2 PCR-Bedingungen für Ex9, Ex10.2, Ex13.2, Ex16.....	26
3.4.3 PCR-Bedingung für Ex10.1.....	26
3.5 Hetero-R .....	26
3.6 Agarose-Gelelektrophorese .....	26
3.7 Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC).....	27
3.7.1 Einführung.....	27
3.7.2 Bestimmung der Schmelzdomäne und Puffergradienten .....	28
3.7.3 Ablauf der DHPLC.....	37
3.7.4 Deutung des Chromatogramms .....	38
3.8 Sequenzierung nach Sanger.....	39
3.8.1 Aufreinigung der PCR-Amplifikate .....	40
3.8.2 Durchführung der Sequenzierung.....	40
3.8.3 Aufreinigung der Sequenzierreaktion.....	41
3.8.4 Auswertung der Sequenzierreaktion.....	41

4 Ergebnisse .....	42
4.1 Patientenkollektiv .....	42
4.2 Tumorentitäten .....	42
4.3 Genetische Veränderungen und Tumorentitäten .....	43
4.4 Polymorphismen und Mutationen .....	44
4.4.1 Intronische Veränderungen .....	45
4.4.2 Veränderungen im nicht-codierenden Bereich .....	45
4.4.3 Veränderungen im codierenden Bereich .....	46
4.4.4 Mutagene Veränderungen .....	47
4.4.5 Mutationen bei Patienten mit lobulären Mammakarzinomen .....	50
4.5 Doppelpeaks im Chromatogramm ohne nachweisbare Veränderung .....	51
4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	51
5 Diskussion .....	53
5.1 Vergleich von Familien mit hereditärem diffusen Magenkarzinom und Familien mit gehäuften Mamma- und Magenkarzinomen .....	53
5.2 Familien mit duktalem Brust- und Magenkarzinomen .....	56
5.3 Zusammenhang der familiären Häufigkeit zwischen unterschiedlichen Entitäten von Mammakarzinomen und Magenkarzinomen .....	57
5.4 Patientin mit CDH1-Veränderung .....	57
5.5 Das Risiko an einem Karzinom zu erkranken in Trägern von CDH1-Mutationen .....	59
5.6 Fazit .....	60
5.7 Methodenkritik .....	60
6 Zusammenfassung .....	62
7 Literaturverzeichnis .....	63
8 Danksagung .....	68
9 Lebenslauf .....	69

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer für die PCR mit Schmelztemperaturen .....	22
Tabelle 2: Ansatz pro 0,2ml PCR-Röhrchen .....	24
Tabelle 3: Ansatz pro 0,2ml PCR-Röhrchen für Exon1 .....	25
Tabelle 4: PCR-Bedingungen für die genannten Exons .....	25
Tabelle 5: Bedingungen für Hetero R .....	26
Tabelle 6: DHPLC-Programm für Exon1 .....	29
Tabelle 7: DHPLC-Programm für Exon 2.....	30
Tabelle 8: DHPLC-Programm für Exon 3 (1. Schmelzdomäne).....	30
Tabelle 9: DHPLC-Programm für Exon 3 (2.Schmelzdomäne).....	31
Tabelle 10: DHPLC-Programm für Exon 4.....	31
Tabelle 11: DHPLC-Programm für Exon 5.....	31
Tabelle 12: DHPLC-Programm für Exon 6 (1. Schmelzdomäne).....	32
Tabelle 13: DHPLC-Programm für Exon 6 ( 2. Schmelzdomäne).....	32
Tabelle 14: DHPLC-Programm für Exon 7.....	32
Tabelle 15: DHPLC-Programm für Exon 8.....	33
Tabelle 16: DHPLC-Programm für Exon 9.....	33
Tabelle 17: DHPLC-Programm für Exon 10.1.....	33
Tabelle 18: DHPLC-Programm für Exon 10.2.....	34
Tabelle 19: DHPLC-Programm für Exon 11.....	34
Tabelle 20: DHPLC-Programm für Exon 12.....	34
Tabelle 21:DHPLC-Programm für Exon 13.1.....	35
Tabelle 22: DHPLC-Programm für Exon 13.2.....	35
Tabelle 23: DHPLC-Programm für Exon 14.....	35
Tabelle 24: DHPLC-Programm für Exon 15 (1. Schmelzdomäne).....	36
Tabelle 25: DHPLC-Programm für Exon 15 (2. Schmelzdomäne).....	36
Tabelle 26: DHPLC-Programm für Exon 16.....	36
Tabelle 27: DHPLC-Programm für „Hotwash“ .....	37
Tabelle 28: DHPLC-Programm für „High Standard“ .....	37
Tabelle 29: DHPLC-Programm für „Low-Standard“ .....	38
Tabelle 30: Aufreinigung der PCR-Amplifikate .....	40
Tabelle 31: Sequenzierungsreaktion.....	41
Tabelle 32: Patientenkollektiv .....	44
Tabelle 33: Intronische Veränderungen .....	45
Tabelle 34: Veränderungen im nicht codierenden Bereichs.....	46
Tabelle 35: Veränderungen im codierenden Bereich .....	47
Tabelle 36: Patienten mit genomischen Veränderungen, die die Aminosäurestruktur betreffen .....	49
Tabelle 37: : Übersicht über die genomischen Veränderungen.....	50
Tabelle 38: Mutationen bei Patienten mit LBC.....	51
Tabelle 39: Klinische und genetische Übersicht über 46 Probanden, die ein bis drei Veränderungen haben .....	52

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wavemaker®-Diagramm: Helical fraction gegen Schmelztemperatur.....	28
Abbildung 2: Wavemaker®- Diagramm Helical fraction gegen Basenposition .....	29
Abbildung 3: Chromatogramm.....	39
Abbildung 4: Elektropherogramm zu c.1774 G>A, p. Ala592Thr.....	48
Abbildung 5: Elektropherogramm zu c.2512 A>G, p.Ser838Gly .....	49
Abbildung 6: Stammbaum der Mutationsträgerin: c.2512 A>G .....	59
Abbildung 7: Agarosegel : PCR-Produkt vom zweiten Amplicon von Exon 13 (s. Pfeil) .....	61

## Abkürzungsverzeichnis

A:	Adenin
BRCA:	breast cancer gene
BP:	Basenpaare
C:	Cytosin
CDH1:	Cadherin 1
DBC:	ductal breast cancer
DGC:	diffuse gastric cancer
DHPLC:	denaturing high performance liquide chromatographie
dNTP:	Deoxynukleotidtriphosphat
ddNTP:	Didesoxynukleotidtriphosphate
G:	Guanin
HBOC:	hereditary breast and ovarian cancer
HDGC:	hereditary diffuse gastric cancer
HGMD:	The Human Gene Mutation Database
LBC:	lobular breast cancer
P(for):	Forward-Primer
P(rev):	Reverse-Primer
T:	Thymin
T <sub>m</sub> :	Schmelztemperaturen
UV:	unknown variant
VUS:	variant of unknown significance

# **1 Einleitung**

## **1.1 Epidemiologie**

Das Mammakarzinom ist das häufigste Karzinom bei Frauen weltweit. Insgesamt waren Mammakarzinome in der Gesamtpopulation im Jahr 2012 nach dem Bronchialkarzinom mit 1,7 Millionen Fällen weltweit das zweithäufigste Karzinom und machten 11,9% aller Karzinomerkrankungen aus. Es ist jedoch nur die fünfhäufigste Todesursache mit 522000 Todesopfern, die durch Tumorerkrankungen verursacht wird, weil es eine relativ gute Prognose hat. In entwickelten Ländern ist das Bronchialkarzinom die häufigste Todesursache bei Frauen (210000 Tote) gefolgt vom Mammakarzinom (198000 Tote).

In weniger entwickelten Ländern ist das Mammakarzinom immer noch die häufigste Todesursache durch Tumorerkrankungen (324000 Tote) (Ferlay et al., 2015). In Deutschland gab es zuletzt etwa 70.000 Neuerkrankungen jährlich. Damit ist auch in Deutschland das Mammakarzinom die häufigste Tumorerkrankung der Frau. Etwa eine von acht Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Jede vierte Frau ist bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre, jede zehnte unter 45 Jahre alt. Die höchste Erkrankungsrate ist in der Gruppe der 65-69-Jährigen. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate (2009-2010) betrug 87% (Robert Koch-Institut, 2013).

## **1.2 Histologie**

Die häufigste maligne Tumorart der weiblichen Brust ist das duktale Mammakarzinom gefolgt vom lobulären Mammakarzinom. Das duktale Mammakarzinom geht vom Milchgang aus und das lobuläre vom Drüsenlappen. Dabei handelt es sich um ein invasives Karzinom, der in das umliegende Gewebe eindringt. Die meisten Mammakarzinome wachsen im oberen äußeren Quadranten, d.h. der Achsel zugewandt.

Von den invasiven Mammakarzinomen müssen die noch nicht malignen Vorstufen unterschieden werden. Das intraduktales (im Milchgang) und das lobuläre In-situ Karzinom sind nicht maligne Vorstufen. Das intraduktales Karzinom kann sich über viele Zentimeter ausbreiten und eine Entfernung der Brust notwendig machen. In-situ Karzinome überschreiten definitionsgemäß nicht die Grenze des Gewebes.



Die meisten Tumore der Brust sind gutartig. Dabei unterscheidet man vom Bindegewebe ausgehende Tumore (Fibrome), Flüssigkeit gefüllte Hohlräume (Zysten) oder Fettumore (Lipome) (Robert-Koch Institut, 2005).

Wichtig für die Therapieentscheidung ist unter anderem der Rezeptorstatus des Brusttumors. Drei unterschiedliche Rezeptoren werden immunhistochemisch unterschieden: Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor und der HER2-Rezeptor (human epidermal growth factor receptor-2). Tumore, bei denen keiner der drei Rezeptoren nachgewiesen werden kann, werden als triple negativ bezeichnet. Diese triple negativen Tumore (15-20% aller Mammakarzinom-Patientinnen) sind am schwierigsten zu behandeln, weil sie vergleichsweise sehr aggressiv sind (Jamdade et al., 2015). Außerdem gibt es unter anderem noch medulläre, metaplastische, mikropapilläre und tubuläre Tumore (McCart Reed et al., 2015). Anhand von Expressionsanalysen können unter anderem vier verschiedene, intrinsische Subtypen unterschieden werden: Luminal A, Luminal B, HER2-positiv und basal like. Die verschiedenen Subtypen sind mit einer unterschiedlichen Aggressivität und Prognose assoziiert (Coleman and Anders, 2017).

### **1.3 Klinik und Diagnostik**

60-70% der Mammakarzinome werden durch die betroffene Frau selbst entdeckt, 15-30% im Rahmen der klinischen Untersuchung durch den Arzt und 8% durch bildgebende Verfahren wie Mammographie und Ultraschall. In der Inspektion können Vorwölbungen, Einziehungen (Plateau-Phänomen) und Orangerhaut (Peau d'orange) auffallen. Außerdem können folgende Veränderungen auf ein malignes Geschehen hinweisen: Fixierung der Brustdrüse auf dem M. pectoralis, Rötung der Haut als Hinweis auf ein inflammatorisches Karzinom (Lymphangiosis carcinomatosa), ekzematöse Hautveränderungen der Mamille (Paget-Karzinom) und Einziehungen der Mamille.

Folgende Befunde sind in der Palpation wegweisend: Knoten, unscharf begrenzte Verhärtungen (maligne Tumore haben meist eine höckerige Oberfläche und eine derbe Konsistenz), eingeschränkte Verschieblichkeit der Brust, Jackson Phänomen (durch Kompression der Haut mit den Fingern entsteht ein Plateau bzw. eine Einziehung der Haut und keine Vorwölbung) und tastbare Lymphknoten axillär, supra- oder infraklavikulär.

Sowohl die Inspektion als auch die Palpation werden an der stehenden und an der liegenden Patientin durchgeführt. Durch Palpation fallen Tumore ab einer Größe von etwa 1,5-2 cm auf.

Außerdem ist blutige Sekretion aus der Mamille verdächtig und muss abgeklärt werden (Diedrich, 2007).

Die Mammographie ist eine bewährte Methode zur Diagnostik des Mammakarzinoms. Sie hat eine Sensitivität von 85-90%. Dabei wird die Brust routinemäßig in zwei Ebenen dargestellt bzw. geröntgt (kraniokaudaler Strahlengang und schräger Strahlengang (45°-Winkel)). 10-15% der Karzinome bleiben unentdeckt (häufig lobuläre Karzinome).

Mikroverkalkungen sind führende röntgendiagnostische Kriterien des In-situ oder des Frühkarzinoms. Eine Neoplasie ist umso wahrscheinlicher, je mehr Verkalkungen in einem bestimmten Gebiet zu finden sind. Benigne Tumore sind meist homogen dicht und glatt begrenzt. 5-8% aller palpablen Tumore lassen sich mammographisch nicht darstellen. Bei Sekretion aus der Mamille wird eine Galaktographie durchgeführt um intraduktale Prozesse (Papillome oder intraduktale Karzinome) auszuschließen. Dazu wird in den Milchgang ein Kontrastmittel gespritzt und die Brust anschließend geröntgt. Kaliberschwankungen sowie Kontrastmittelabbrüche sind Hinweise auf einen pathologischen Prozess. Rückschlüsse auf die Histologie lassen sich daraus nicht gewinnen.

Bei karzinomverdächtigen Befunden in der Mammographie muss laut S3-Leitlinie zur Früherkennung des Mammakarzinoms in Deutschland eine Mammasonographie obligat durchgeführt werden. Es werden Schallköpfe mit einer Frequenz von 7,5-10 mHz eingesetzt (Manfred Stauber, 2007).

## **1.4 Therapie**

Patienten mit Mammakarzinomen stellen eine sehr heterogene Gruppe dar, was einen individualisierten Therapieansatz aus Operation, Chemotherapie, Antihormontherapie, gezielter Antikörpertherapie und Bestrahlung notwendig macht (Roche and Vahdat, 2011, Apuri, 2017).

Die chirurgische Entfernung des Mammakarzinoms spielt immer noch eine wesentliche Rolle in der Behandlung von Mammakarzinomen. Je nach Größe des Tumors und individueller Situation der Patientin wird zwischen brusterhaltender Chirurgie und Mastektomie (komplette Entfernung der Brust) unterschieden (McCready et al., 2005). Das Mammakarzinom metastasiert überwiegend in die regionalen Lymphknoten der Axilla (Manfred Stauber, 2007). Um den therapieentscheidenden Lymphknotenstatus der Axilla beurteilen zu können, wird eine Biopsie des Wächterlymphknotens (englisch: sentinel lymph node) genommen. Dadurch

wird die Häufigkeit der kompletten Ausräumung (Axilladissektion) der Lymphknotenlevel 1 und 2 verringert (Langer et al., 2009).

In Abhängigkeit von der Tumorgöße, dem Hormonrezeptorstatus, dem HER2-Status und dem Wunsch nach brusterhaltender Chirurgie, werden neoadjuvante- und adjuvante Chemotherapien mit zum Beispiel Taxanen, platinhaltigen Derivaten oder Anthrazyklinen durchgeführt. Beim HER2 positivem Mammakarzinom gibt es zusätzlich die Möglichkeit, eine zielgerichtete Therapie mit Antikörpern wie Trastuzumab oder Pertuzumab durchzuführen. Die Therapie hat präoperativ die Verkleinerung des Tumors, und postoperativ die Verbesserung des rezidivfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens zum Ziel. In der metastasierten Situation kann zusätzlich der Antikörper Bevacizumab eingesetzt werden (Buchholz et al., 2003, O'Shaughnessy, 2005, Apuri, 2017).

Zusätzlich zu den o.g. Therapieoptionen verbessert eine adjuvante Bestrahlung der Brust nach brusterhaltender Therapie oder Ablatio die Überlebenswahrscheinlichkeit und senkt das Risiko für Rezidive (Rivera et al., 2015, Gentilini et al., 2017).

Hormonrezeptorpositive Tumore werden in der adjuvanten und metastasierten Situation mit einer Antihormontherapie (AHT) behandelt. Dabei wird zwischen prä- und postmenopausalen Patientinnen unterschieden. Bei prämenopausalen Frauen kommt überwiegend der selektive Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen und bei postmenopausalen Frauen kommen Aromatase-Inhibitoren wie Letrozol, Anastrozol oder Exemestan zum Einsatz. Dadurch wird das Wachstum der Tumorzellen beeinflusst (Manfred Stauber, 2007, Draganescu and Carmocan, 2017).

## **1.5 Das lobuläre Mammakarzinom**

Mit 10-15% aller Tumorentitäten zählt das lobuläre Mammakarzinom (englisch: lobular breast cancer, LBC) zu den häufigsten Mammakarzinom-Entitäten nach dem duktalem Mammakarzinom (DBC) (Sagara et al., 2015). Invasiv lobuläres Mammakarzinom wird durch gewisse morphologische Charakteristika definiert, wie zum Beispiel: kleine, diskohäsive und unpolare Tumorzellen, die das umliegende Gewebe einzeln infiltrieren (Christgen and Derksen, 2015). Die Tumorzellen sind typischerweise klein, monomorph, mit rundem oder eingedelltem Nukleus und einem dünnen Saum Zytoplasma. In einigen Zellen gibt es im Zytoplasma ein mit Muzin gefülltes Lumen, welches manchmal groß genug ist, um diese als Siegelringzellen aussehen zu lassen (McCart Reed et al., 2015). Die Tumore sind häufiger Östrogen- und Progesteron-Rezeptor-positiv. LBC ist zu 92,7% Östrogen-Rezeptor-positiv

und zu 67,4% Progesteron-Rezeptor-positiv. Im Vergleich dazu ist DBC zu 81,2% Östrogen-Rezeptor-positiv und zu 60,2% Progesteron-Rezeptor-positiv. LBC ist fast immer HER2 negativ (Arpino et al., 2004).

Im Vergleich zu Patienten mit duktalem Mammakarzinom sind Patienten mit lobulärem Mammakarzinom bei Diagnose im Durchschnitt drei Jahre älter. Die Proliferation ist deutlich geringer (Arpino et al., 2004). Außerdem ist LBC bei Diagnose meist im Stadium fortgeschrittener (Stadium 3/4), hat eine größere Tumormasse (höheres pT-Stadium) und hat häufiger in Lymphknoten metastasiert (Li et al., 2005). Unter neoadjuvanter Chemotherapie ist die pathologische Komplettremission mit 0-11% sehr gering. IN 17-65% der Fälle werden sogenannte *CDH1* Mutationen nachgewiesen (Christgen et al., 2016). In 50% von invasivem lobulären Mammakarzinom können Mutationen in *PIK3CA*, *PTEN* und *AKT1* nachgewiesen werden. HER2 und HER3 Mutationen wurden in 5.1% und 3.% detektiert (Desmedt et al., 2016).

LBC hat im Vergleich zu DBC eine niedrigere Langzeitüberlebensrate. Damit verbunden sind Fernmetastasen, Rezidive und eine höhere Sterblichkeit (Rakha et al., 2008).

LBC metastasiert dreimal so häufig in das Peritoneum, den Gastrointestinaltrakt und die Ovarien als DBC. Auch kontralaterale Tumore der Brust werden doppelt so häufig beobachtet (Arpino et al., 2004).

Nur 2,2% aller mit BRCA1 assoziierten Tumore sind lobulär. Im Gegensatz dazu sind bei BRCA2 8,4% der Tumoren lobulär (Mavaddat et al., 2012).

Patienten mit LBC haben häufiger Verwandte ersten Grades mit einem Malignom als Patienten mit DBC (37,8% vs. 21,6%  $P < 0,0001$ ) (Chikman et al., 2015).

## 1.6 Risikofaktoren

Weibliche Hormone erhöhen das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken. Jeder Faktor, der die Exposition des Körpers mit weiblichen Hormonen erhöht, ist ein potentieller Risikofaktor (Dossus and Benusiglio, 2015). Eine frühe Menarche und späte Menopause erhöhen das Risiko für ein Mammakarzinom. Dabei steigt das Risiko stärker durch eine frühere Menarche als durch eine spätere Menopause (2012). Für jedes Jahr, das die Menarche später einsetzt, sinkt das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken für ein prämenopausal diagnostiziertes Mammakarzinom um 9% und um 4% für ein postmenopausal diagnostiziertes Mammakarzinom. Das Risiko sinkt nach der Menopause erheblich. Prämenopausale Frauen haben im Vergleich zu postmenopausalen Frauen gleichen Alters ein

40% höheres Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken. Dadurch beobachtet man eine starke Abflachung der Inzidenzrate bei ca. 50-jährigen Frauen, der sogenannte „Clemmesen hook“ (2012).

Mit jedem Jahr, das eine Frau ihr erstes Kind später bekommt, steigt das Risiko für ein Mammakarzinom um 5% für ein prämenopausal diagnostiziertes Mammakarzinom und um 3% für ein postmenopausal diagnostiziertes Mammakarzinom. Jede ausgetragene Schwangerschaft reduziert das Risiko um 3% für Mammakarzinome, die vor der Menopause diagnostiziert werden und um 12% für Mammakarziome, die nach der Menopause diagnostiziert werden (Clavel-Chapelon and Gerber, 2002).

Auch exogen zugeführte Hormone erhöhen das Risiko für ein Mammakarzinom. Die Hauptquelle für exogene Hormone ist die postmenopausale Hormontherapie. Im Jahr 2002 hat die Women's Health Initiative (WHI) eine Studie durchgeführt, in der gezeigt wurde, dass eine Kombination aus Östrogenen und Progestagenen das Risiko für ein invasives Mammakarzinom um bis zu 26% erhöht im Vergleich zur Placebo-Gruppe (Rossouw et al., 2002). Das Risiko von Östrogen-Monopräparaten ist nicht abschließend geklärt (Dossus and Benusiglio, 2015).

Das Risiko durch postmenopausale Hormontherapie an einem Mammakarzinom zu erkranken, ist für LBC größer als für DBC. Auch Studien, die sich auf hormonrezeptorpositive Tumore beschränkt haben, zeigen eine stärkere Assoziation mit LBC als mit DBC. Dies lässt darauf schließen, dass die erhöhte Sensitivität von LBC nicht vom Hormonrezeptorstatus abhängt, sondern durch andere Mechanismen ausgelöst wird (Dossus and Benusiglio, 2015).

Orale Kontrazeptiva standen lange im Verdacht das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken zu erhöhen. Doch neuere Studien zeigen, dass das Risiko im Vergleich zu Frauen, die nicht mit oralen Kontrazeptiva verhüten, nicht signifikant gesteigert ist. Das mag an den geringen Dosen liegen, die in den neueren Präparaten benutzt werden. Bei Frauen, die zehn Jahre vor der Diagnose aufgehört haben orale Kontrazeptiva zu nehmen, war das Mammakarzinom interessanterweise nicht so weit fortgeschritten wie bei Frauen, die nie orale Kontrazeptiva genommen haben, wodurch ein gewisser protektiver Einfluss von oraler Kontrazeption impliziert wird (Hilakivi-Clarke et al., 2013).

Das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken erhöht sich für alle Entitäten bei Frauen, die durchschnittlich mehr als sieben alkoholische Getränke pro Woche trinken. Besonders postmenopausale Frauen sind davon betroffen. Bei ihnen wird häufiger LBC diagnostiziert (Li et al., 2006).

## 1.7 Genetische Risikofaktoren

Neben Lifestyle-Faktoren spielen auch genetische Ursachen eine Rolle für das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken. In einer Metastudie von 52 Studien, in denen die Häufigkeit von Mammakarzinomen bei Verwandten ersten Grades (Mutter, Tochter, Schwester) von Mammakarzinom-Patientinnen im Vergleich zu nicht betroffenen Frauen untersucht wurden, hat sich gezeigt, dass die Häufigkeit an einem Mammakarzinom zu erkranken steigt, je mehr Verwandte ersten Grades ein Mammakarzinom bekommen. Das relative Risiko steigt mit der Anzahl von betroffenen Verwandten. Im Vergleich zu Frauen ohne betroffene Verwandte steigt das relative Risiko um den Faktor 1,8 für einen betroffenen Verwandten, um 2,93 für zwei betroffene Verwandte und um 3,90 für drei oder mehr betroffene Verwandte (2001).

Studien über Zwillinge, von denen einer an einem Karzinom erkrankt ist, haben gezeigt, dass das Risiko für Tumorerkrankungen (darunter auch das Mammakarzinom) bei eineiigen Zwillingen, die alle Gene teilen, doppelt so hoch ist als bei zweieiigen Zwillingen, die nur etwa die Hälfte aller Gene teilen (Lichtenstein et al., 2000). Daraus lässt sich eine entscheidende Rolle der genetischen Faktoren für die Entstehung von Mammakarzinomen ableiten. In der gleichen Studie (Lichtenstein et al., 2000) wurde das Risiko von genetischen Faktoren für die Entstehung von Mammakarzinomen auf 27% geschätzt. Damit werden genetische Faktoren zu etwa einem Drittel für die Entstehung von Mammakarzinomen verantwortlich gemacht. Die restlichen zwei Drittel werden durch die oben beschriebenen Umwelt- und Lifestyle-Faktoren erklärt.

Die Hauptgene für das HBOCS (hereditary breast and ovarian cancer syndrome) sind immer noch die Gene *BRCA1/2*, daneben wurden jedoch weitere Gene identifiziert, die eine mittlere Risikoerhöhung bewirken. Dazu gehören folgende Gene: *TP53*, *PTEN*, *CDH1*, *STK11*, *ATM*, *PALB2* und *CHEK2* (Economopoulou et al., 2015). Auch das *MRE11A* Gen gehört zu den Genen mit einem erhöhten Risiko für das Mammakarzinom (Bartkova et al., 2008).

Bis zum 70 Lebensjahr beträgt das kumulative Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken bei Trägern von *BRCA1*-Mutationen 60%. Bei ihnen erkrankt zudem nach Diagnose eines unilateralen Mammakarzinoms zu 83% auch die kontralaterale Seite. Weiterhin haben sie ein Risiko von 59%, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken.

Bei Träger von *BRCA2*-Mutationen besteht ein Risiko von 55% an einem Mammakarzinom zu erkranken. Ihr Risiko für ein kontralaterales Mammakarzinom liegt bei 62%. Das Risiko für ein Ovarialkarzinom wird mit 16,5% angegeben (Mavaddat et al., 2013).

Die Mehrheit von Familien mit HBOC sind *BRCA1*- und *BRCA2*-negativ (Ford et al., 1998).

In populationsbasierten Studien mit unselektierten Fällen von Mammakarzinomen betrug die Mutationsrate 2% bei den unter 55-Jährigen. Die Prävalenz ist bei den unter 35-jährigen Brustkarzinompatientinnen und bei Frauen mit betroffenen Verwandten deutlich größer (2000).

## 1.8 *CDH1* und E-Cadherin

Das *CDH1*-Gen (Cadherin 1) liegt auf dem Chromosom 16q22 und codiert für das Protein E-Cadherin (Dossus and Benusiglio, 2015). E-Cadherine gehören zur Familie der transmembranen Glykoproteine. Durch homophile Interaktion formen sie mittels Calcium Adhäsionen zwischen Zellen und geben so Zellverbänden ihre Struktur (Takeichi, 1991). Außerdem spielt E-Cadherin eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Zellpolarität.

E-Cadherine binden über  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und p120-Catenine mit ihrer intrazellulären Domäne an das Aktin-Zytoskelett der Zelle und sind damit essentieller Bestandteil der Adhärens-Kontakte. E-Cadherine werden durch die Bindung zu den Cateninen reguliert. Die durch die E-Cadherine vermittelte Zelladhäsion ist maßgeblich an der Lebensfähigkeit der Zelle beteiligt. Verliert die Zelle die Adhäsion mit dem Zellverband, kommt es zur Anoikis. Dabei handelt es sich um einen programmierten Zelltod von Zellen, die den Kontakt zu ihrem Zellverband verloren haben, ähnlich der Apoptose (McCart Reed et al., 2015).

E-Cadherine haben Tumorsuppressor-Effekte. Ihre Zell-Zell Adhäsion unterdrückt die Invasivität von Zellen. Ein teilweiser oder ganzer Verlust von E-Cadherin führt zur Malignität von Tumoren (Berx et al., 1995). Die Mutationsrate wird in der Literatur mit unter 1% für Patienten mit einem Mammakarzinom angegeben (Euhus, 2014).

Mutationen in *CDH1* sind hauptsächlich mit einem diffusen Magenkarzinom (englisch diffuse gastric cancer; DGC) vergesellschaftet. Mutationen werden in Familien mit mehreren Fällen von DGC, DGC in jungem Alter oder in Kombination aus DGC und LBC gefunden. Diese Diagnosen werden auch als das diffuse Magenkarzinomsyndrom (englisch: diffuse gastric cancer; HDGC) bezeichnet. Dabei wurde in Familien mit vermehrten Fällen von DGC oft auch LBC festgestellt (Benusiglio et al., 2013). Des Weiteren kommen Mutationen gehäuft in LBC vor (Berx et al., 1996). In fast allen Fällen von LBC wird kein E-Cadherin exprimiert. In wenigen Ausnahmen wird aber auch bei LBC E-Cadherin in der immunhistochemischen Färbung nachgewiesen. Weitere Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass die dort vorhandenen E-Cadherin-Catenin-Komplexe fehlerhaft sind und E-Cadherine nur ungenügend ihre Funktion ausüben können (Rakha et al., 2010).

## 1.9 Familiäres diffuses Magenkarzinomsyndrom

Damit in einer Familie ein diffuses Magenkarzinomsyndrom (HDGCS) diagnostiziert werden kann, müssen folgende Kriterien erfüllt sein (van der Post et al., 2015):

- 1) Mindestens zwei Fälle eines Magenkarzinoms unabhängig vom Alter, eines davon ist ein diffuses Magenkarzinom (DGC= diffuse gastric cancer)
- 2) Ein Fall von diffusem Magenkarzinom im Alter unter 40 Jahren
- 3) Ein Familienmitglied ist an diffusem Magenkarzinom und LBC erkrankt, eine der beiden Diagnosen im Alter unter 50 Jahren

Für die Entwicklung dieses Syndroms werden Mutationen in *CDH1* verantwortlich gemacht (Guilford et al., 1998). Das Risiko, bis zum 80. Lebensjahrs an einem diffusem Magenkarzinom zu erkranken, ist für Männer 70% und für Frauen 56%, die positiv auf eine Mutation in *CDH1* getestet wurden. Das Risiko bis zum 80. Lebensjahr an LBC zu erkranken, beträgt 42% bei Frauen, die positiv auf eine *CDH1*-Mutation getestet sind (Hansford et al., 2015).

## 1.10 Zielsetzung der Arbeit

*CDH1* Mutationen stehen sowohl mit dem diffusen Magenkarzinom als auch mit dem lobulärem Mammakarzinom in Verbindung. Eine hohe Mutationsrate wird in Familien gefunden, die die Kriterien für das diffuse Magenkarzinomsyndrom erfüllen. In diesen Familien wurde bei Frauen häufig ein lobuläres Mammakarzinom noch vor einem diffusen Magenkarzinom diagnostiziert. LBC könnte daher der erste Hinweis für eine *CDH1*-Mutation sein (Benusiglio et al., 2013).

In dieser Arbeit wurden 97 nicht verwandte Probanden auf *CDH1*-Mutationen untersucht, um herauszufinden, ob *CDH1* eine Rolle bei erblichen Brust und Eierstockkrebs spielt. Dabei erfüllten die Probanden die Kriterien für erbliche Brust- und Eierstockkarzinome (HBOC= hereditary breast- and ovarian cancer). Ein Großteil der Patienten hatte neben einer positiven Familienanamnese für Brust- und Eierstockkarzinome auch eine positive Familienanamnese für Magenkarzinome. Alle untersuchten Indexpersonen waren negativ auf *BRCA1/2*-Mutationen getestet.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob *CDH1* als Gen bei der Panel-Diagnostik eingesetzt werden kann. Des Weiteren soll das Mutationsspektrum in *CDH1*



ermittelt und damit evaluiert werden, ob es bestimmte Hotspot-Regionen im Gen gibt. Dies würde die weitere Mutationssuche in diesen Familien vereinfachen.

## 2 Materialien

### 2.1 Verbrauchte Chemikalien

Agarose (Biozym Gold Agarose)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch
Aqua dest. (LiChrosolv®)	Merck Millipore, Darmstadt
BigDye® Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
Discoverase™ dHPLC DNA-Polymerase	Life Technologies, Carlsbad, USA
Discoverase™ PCR Buffer	Life Technologies, Carlsbad, USA
DNA Loading Dye (2x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DNA Molecular Weight Marker VI	Roche, Basel, Schweiz
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethidiumbromid (1% in A. dest)	Merck, Darmstadt
Exonuclease I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hi-Di™- Formamide	Life Technologies, Carlsbad, USA
Magnesium Sulfate	Life Technologies, Carlsbad, USA
Tris-Borat-EDTA Puffer	Merck, Darmstadt
Q-Solution	Qiagen, Venlo, Niederlande
Wave Optimized Buffer A	Transgenomics, Glasgow, UK
Wave Optimized Buffer B	Transgenomics, Glasgow, UK

Wave Optimized Syringe Wash Solution	Transgenomics, Glasgow, UK
Wave Optimized Solution D	Transgenomics, Glasgow, UK
Wave High-Range Mutation Control Standard	Transgenomics, Glasgow, UK
Wave Low-Range Mutation Control Standard	Transgenomics, Glasgow, UK

## 2.2 Arbeitsgeräte

Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Agarose-Gelkammern mit Kämme	Bio-Rad, München
Eismaschine AF100	Scotsman, Mila, Italien
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Image Master VDS	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Laborschüttler	Heidolph, Schwabach
Mikrowelle R-234	Sharp, Hamburg
Peltier Thermal Cycler, PTC 200	MJ Research Inc., St. Bruno, Canada
Genetic Analyzer 3130	Life technologies™, Carlsbad, USA
UV Vis Spectrophotometer, Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Waage BL 610	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank (60°)	Memmert, Schwabach
Wave DNA Fragment Analysis System	Transgenomics, Glasgow, UK

## 2.3 Verbrauchsutensilien

Biosphere Filter Tips

Sarstedt AG&Co. (Nümbrecht)

PCR Single Cap, Soft strips, 0,2 ml

Biozym Scientific GmbH, Hessisch

Oldendorf

## 2.4 Software

MutationDiscovery.com<sup>TM</sup>

Transgenomics, Glasgow, UK

Nanodrop 2000

Transgenomics, Glasgow, UK

Navigator<sup>TM</sup> Software

Transgenomics, Glasgow, UK

## **3 Methoden**

### **3.1 Messung der DNA-Konzentration und Reinheit**

Mit einem Spectrophotometer wurde die Konzentration und Reinheit der DNA gemessen. Dies war nötig, um für die PCR-Ansätze die gleiche Menge von DNA zu verwenden. Das Spectrophotometer misst die Intensität von UV-Licht vor und nach der DNA-Probe im Vergleich zu einem Referenzwert bestehend aus dem TE-Puffer.

Für diese Arbeit wurde das Spectrophotometer Nanodrop 2000 mit der dazugehörigen Software benutzt. Es misst die Konzentration der DNA bei 260nm bzw. 280nm im Vergleich zum TE-Puffer.

Nach einem Nullabgleich mit 2 µl TE-Puffer werden jeweils 2 µl der DNA-Lösung gemessen. Die Konzentration wird in ng/µl angegeben. Die Reinheit der DNA-Lösung wird aus dem Quotienten der Absorption bei 280nm und 230nm angegeben. Dieser Quotient liegt im Idealfall zwischen 1,8 und 2,0.

Alle verwendeten Proben haben den nötigen Anforderungen entsprochen.

### **3.2 Primer Design**

Für das Designen der Primer wurde die MutationDiscovery.com™ Homepage benutzt. Die Homepage basiert auf der Primer3-Software.

Es wurde darauf geachtet, eine Länge von unter 400 Basenpaaren (BP) pro DNA-Abschnitt (Amplicon) einzuhalten. Zu lange Amplicons können zu viele Schmelzdomänen enthalten. Dies führt dazu, dass sich die Anzahl der Analysetemperaturen in der DHPLC erhöht.

Eine Primerlänge von 18 BP bis 25 BP wurde angestrebt, um ein spezifisches Binden zu ermöglichen.

Die Primer wurden mindestens 30 bp von den Intron/Exon Grenzen entfernt gesetzt, damit dieser Bereich in der Sequenzierung noch gut zu beurteilen ist. Häufig sind gerade die Anfänge und Enden eines Amplicons in der Sequenzierung schwierig zu beurteilen.

Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass beide Primer eines Amplicons in etwa die gleiche Schmelztemperatur hatten, um ein gleichzeitiges Annealing während der PCR zu gewährleisten.

In der folgenden Tabelle sind die Primer angegeben, die für die PCR benutzt wurden:

**Tabelle 1: Primer für die PCR mit Schmelztemperaturen**

Exon	Forward-Primer	Reverse-Primer	Amplicon Länge (BP)
1	CAGCCAATCAGCGGTACGGG (Tm: 60,37°C)	CGGAGCTTGCGGCCCGAAT (Tm: 60,19°C)	291
2	GAGGGAACCCTCCGAGTCAC (Tm: 60,37°C)	GGAGTGCAATTTCTCGGCCC (Tm: 58,32°C)	236
3	GGAATGCTCTTGTCTTTAATCTG TCCA (Tm: 58,2°C)	GAAACCTGGATTAGACAGCGC AC (Tm: 59,02°C)	345
4	GACCTGAAGTATCCGTCTTGAAT TGTC (Tm: 59,72°C)	CTTGGTACTTCTCTGCCAAATC CC (Tm: 59,22°C)	257
5	GACCCAGTGTTGGGATCCTTCTT TA (Tm: 59,4°C)	GATCTGCGGATCCAGCATGGG (Tm: 60,53°C)	294
6	CACTCTGCTCTGGCTGGGC (Tm: 60,19°C)	TTGGGCTTGGACAACACTTTGG G (Tm: 59,02°C)	302
7	GACCCAGTCCCAAAGTGCAGC (Tm: 60,53°C)	GGATTGAGCTAATACACATTTG TCCTC (Tm: 58,2°C)	288
8	CAAAGGTGGCTAGTGTTTCCTGGT (Tm: 59,02°C)	CCATGAGCAGTGGTGACACTTA GTT (Tm: 59,4°C)	261
9	GCTAGCAGTCTTGGTACTTTG (Tm: 54,67°C)	GCTGTGAGGATGCCAGTTTCT (Tm: 56,63°C)	277
10(1)	GGCAGAAACCACAGTTACTT (Tm: 52,17°C)	CTCGGACACTTCCACTCT (Tm: 53,16°C)	300
10(2)	CACCTCCACAGCCACCGT (Tm: 57,72°C)	GGTCTTGACAGACAAATGACA A (Tm: 53,68°C)	278
11	CAGCTACATGTTGTTTGCTGGTC C (Tm: 59,22°C)	GAAGTGAAGTACTAGTAGGAGGT CG (Tm: 59,02°C)	257
12	GGTCTGGTGGAAGGCAATGGG (Tm: 60,53°C)	GGGAAGCATGGCAGTTGGAGC A (Tm: 60,67°C)	348
13(1)	GCGGGTGTCTTTAGTTCAC TAGC (Tm: 59,02°C)	GACAGGCTGTGCCTTCCTACAG (Tm: 60,67°C)	261
13(2)	GCCTTAGAGGTGGGTGACTACA A (Tm: 59,02°C)	CCAGGAAATAAACCTCCTCCAT T (Tm: 55,46°C)	260
14	CTGGCCTTCTTTATCTTTGGCTCT C (Tm: 59,4°C)	CCTCTTACTAATCATTGCTTCTT CCGA (Tm: 58,2°C)	257
15	GCAGTGAAGGCATCATCCAACC A (Tm: 59,02°C)	CCTCCTGAGCTTAGAGATGAGC (Tm: 58,81°C)	303
16	ACAGGTGTGCCCTTCCTTTCAC (Tm: 58,81°C)	CTGCATCACTAACCAGTCTCTT T (Tm: 55,46°C)	392
Tm= Schmelztemperaturen A= Adenin; C= Cytosin G= Guanin T= Thymin			

Für das Exon 10 und das Exon 13 mussten jeweils zwei Amplicons benutzt werden, die sich jeweils überschneiden, um das komplette Exon abzudecken. Dadurch wurde erreicht, dass die Amplicons nicht länger als 400bp wurden.

Unter der jeweiligen Sequenz der Primer ist die entsprechende Schmelztemperatur ( $T_m$ ) in Grad Celsius angegeben.

Die Primer wurden in lyophilisierter Form geliefert, d.h. sie mussten mit Aqua dest. verdünnt werden. Vom Hersteller wurde die Menge Aqua dest. angegeben, die gebraucht wurde um eine Konzentration von 100 pmol/ $\mu$ l zu erreichen. Das Aqua dest. wurde dann zum Primer dazu pipettiert und gevortext, damit sich der Primer komplett im Aqua dest. löst.

### **3.3 PCR (Polymerase chain reaction)**

Die PCR dient der Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte (Mullis et al., 1986). Dafür benötigt man grundsätzlich den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt, Primer, Desoxyribonukleotide und eine hitzestabile Polymerase. Die PCR beruht auf drei grundlegenden Schritten:

- 1) Denaturierung: Die doppelsträngige DNA wird bei 90-95°C aufgeschmolzen, so dass sich DNA-Einzelstränge bilden, an die sich die Primer binden können.
- 2) Annealing: Die Reaktion wird auf eine von den Primern abhängige Temperatur heruntergekühlt, meist 58°C bis 65°C, damit diese sich an den vorgesehenen Stellen der DNA-Stränge binden können.
- 3) Elongation: Die Polymerase synthetisiert nun die komplementären Stränge, in dem sie von den Primern ausgehend bei einer bestimmten Temperatur, meist 68°C, die Desoxyribonukleotide an die Einzelstränge bindet.

Diese drei Schritte beschreiben einen Zyklus, welcher nun mehrfach wiederholt wird. Dabei werden die von den Primern eingegrenzten DNA-Abschnitte exponentiell vervielfältigt. Die Bereiche, die den zu vervielfältigenden Abschnitt umgeben, müssen bekannt sein, damit dort die Primer komplementär binden können. Das für die Reaktion nötige chemische Milieu wird durch Puffer und Magnesiumchlorid gegeben, damit die Polymerase optimal arbeiten kann.

Für jede PCR der 18 Amplicons wurde die gleiche Vorgehensweise eingehalten. Alle Ansätze wurden frisch auf Eis zusammengestellt. Dabei wurden aus H<sub>2</sub>O, Puffer, Forward-Primer, Reverse-Primer, dNTP (Deoxynucleotide) und Enzymen (die Enzyme katalysieren die PCR-Reaktion) ein Mastermix pipettiert. Dadurch wurden die Messungsungenauigkeiten verringert. Zu einem Volumen von 45 µl Mastermix wurden dann speziell für jede Probe 5 µl DNA dazu gegeben (Mengenangabe: s. Tabelle 2).

**Tabelle 2: Ansatz pro 0,2ml PCR-Röhrchen**

	Gesamtvolumen: 50µl	Stammlösung	Endkonzentration
H <sub>2</sub> O	27,5µl		
dNTP	2,5µl	2mM	0,1mM
P(for)	2µl	5nM	0,2nM
P(rev)	2µl	5nM	0,2nM
Enzym	1µl		1U/µl
Puffer	10µl	5x	1x
DNA	5µl	10ng/ µl	50ng <sup>1</sup>
1) Gesamtmenge der enthaltenen DNA			

Für Exon 1 wird ein anderer Ansatz verwendet, weil die Primer sehr GC-reiche Sequenzen (GC= Guanin und Cytosin) enthielten. Diese GC-reichen Sequenzen benötigen höhere Schmelztemperaturen, da diese Basenpaare zwischen Guanin und Cytosin durch drei Wasserstoffbrückenbindungen gebildet werden. Deshalb wird bei den Ansätzen für Exon 1 Q-Solution zur Stabilisierung der GC-reichen Abschnitte und doppelt so viel DNA verwendet. Q-Solution ist speziell von der Firma Quiagen zur Amplifizierung GC-reicher Sequenzen hergestellt.

Daraus ergibt sich für Exon 1 folgender Ansatz:



**Tabelle 3: Ansatz pro 0,2ml PCR-Röhrchen für Exon1**

	Gesamtvolumen: 50µl	Stammlösung	Endkonzentration
H <sub>2</sub> O	12,5µl		
dNTP	2,5µl	2mM	0,1mM
P(for	2µl	5nM	0,2nM
P(rev)	2µl	5nM	0,2nM
Enzym	1µl		1U/µl
Puffer	10µl	5x	1x
Q-Solution	10µl	5x	1x
DNA	10µl	10ng/ µl	100ng <sup>1</sup>
1) Gesamtmenge der enthaltenen DNA			

### 3.4 PCR- Bedingungen

Die Bedingungen für die in dieser Arbeit angewandten PCRs unterscheiden sich nur in den verschiedenen Annealingtemperaturen. Diese werden durch die unterschiedlichen Anteile an GC und die verschiedene Länge der Primer bestimmt. Je mehr GC ein Primer hat und je länger er ist, desto größer wird die benötigte Annealingtemperatur.

#### 3.4.1 PCR-Bedingungen für Ex1, Ex2, Ex3, Ex4, Ex5, Ex6, Ex7, Ex8, Ex11, Ex12, Ex13.1, Ex14 und Ex15

**Tabelle 4: PCR-Bedingungen für die genannten Exons**

	Temperatur	Zeit
Step 1	94°C	3min
Step 2	94°C	0,5min
Step 3	64°C	1min
Step 4	68°C	1min
Step 5	Go to Step2	35x
Step 6	68°C	10min
Step 7	10°C	für immer
Step 8	End	

### 3.4.2 PCR-Bedingungen für Ex9, Ex10.2, Ex13.2, Ex16

Die PCR-Bedingungen unterscheiden sich von dem o.g. im Schritt 3. Hier wurde eine Temperatur von 59°C verwendet. Die anderen Parameter blieben unverändert.

### 3.4.3 PCR-Bedingung für Ex10.1

Die PCR-Bedingung unterscheidet sich von dem o.g. im Schritt 3. Hier wurde eine Temperatur von 56°C verwendet. Die anderen Parameter blieben unverändert.

## 3.5 Hetero-R

Im Anschluss an die eigentliche PCR wurde noch ein weiteres Programm (Hetero-R) laufen gelassen. Dieses Programm diente dazu, die doppelsträngige DNA bei hoher Temperatur aufzuschmelzen. Durch langsames schrittweises Abkühlen binden sich Wildtyp und mutierte Stränge wieder aneinander. Dadurch entstehen untypische Bindungen. Diese sind dann in der DHPLC (denaturing high performance liquid chromatographie) leichter detektierbar (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5: Bedingungen für Hetero R**

	Temperatur	Zeit
Step 1	95°C	5min
Step 2	95°C	0,06sec
Step 3	-0,1°C/cycle	
Step 4	Go to 2	300x
Step 5	10°C	for ever

## 3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können Erfolg und Misserfolg der PCR beurteilt werden. Dazu wird ein 2%-Agarosegel gegossen. In dem Gel befinden sich Taschen, in die das PCR-

Produkt gegeben wird. Legt man nun eine Spannung an, wandern die PCR-Produkte gemäß ihrer Eigenladung durch das Gel und teilen sich ihrer Größe entsprechend auf.

In dieser Versuchsabfolge wurden 3µl PCR-Produkt, 2µl Ladepuffer und 5µl Aqua dest. in eine Tasche gegeben. Zum Vergleich wurden noch zwei Marker als Längenstandard in jeweils zwei Taschen gegeben. Die Elektrophorese wurde für 33min bei folgenden Bedingungen durchgeführt: 100V, 60mA und 10W.

Danach wurde das Gel in 1% iger Ethidiumbromidlösung gewaschen. Das Ethidiumbromid bindet an die DNA-Struktur und fluoresziert unter UV-Licht.

Die DNA-Ethidiumbromid Verbindung wurde mit dem ImageMaster VSD mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

### **3.7 Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)**

#### **3.7.1 Einführung**

Die DHPLC ist eine sehr effiziente Methode, um Mutationen in den amplifizierten Genabschnitten nachzuweisen. Die DHPLC ist eine Flüssigkeitschromatographie, bei der mit Hilfe von unterschiedlichen Schmelzverhalten zwischen Homo- und Heteroduplex-DNA-Mutationen unterschieden wird.

In der DHPLC unterscheidet man eine mobile Phase von einer stationären Phase. In der mobilen Phase befindet sich die injizierte DNA, welche mit Hilfe von Triethylammoniumacetat (TEAA) mit der Säulenmatrix (stationäre Phase) interagiert (Xiao and Oefner, 2001). Die Säulenmatrix besteht aus alkylierten, hydrophoben Polystyren-Divinylbenzol Partikeln (Oefner and Huber, 2002).

Diese Interaktion wird durch hohe Temperatur und unterschiedliche Acetonitrilkonzentrationen durchbrochen. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass Heteroduplices schwächer an die Säulenmatrix binden als Homoduplices. Steigt über die Zeit bei gleicher Temperatur die Konzentration von Acetonitril an, lösen sich die Heteroduplices vor den Homoduplices von der Säule und werden unter einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254nm detektiert (Arnold et al., 1999).

### 3.7.2 Bestimmung der Schmelzdomäne und Puffergradienten

Für jedes Amplicon muss die optimale Schmelzdomäne gefunden werden.

Um zwischen Homo- und Heteroduplices gleicher Länge unterscheiden zu können, müssen diese partiell denaturiert werden. Bei optimaler Schmelzdomäne liegen noch 70-85% des Fragments als Doppelstrang vor (Schmitt et al., 2000). Dies wird bei Temperaturen zwischen 50°C und 70°C erreicht. Entscheidend für die Temperatur ist der GC-Gehalt und die Länge des Fragments (Oefner and Huber, 2002).

In dieser Arbeit wird die Wavemaker®-Software von Transgenomic® benutzt. Diese Software ermöglicht nach Eingabe der zu analysierenden DNA-Sequenz die genaue Bestimmung der optimalen Schmelzdomäne. Es wurde eine Schmelzdomäne pro Amplicon angestrebt. Bei einigen Amplicons waren auch zwei Schmelzdomänen nötig. Die ersten und letzten 30 bp wurden dabei vernachlässigt, da diese intronische und damit nicht kodierende Bereiche repräsentieren.

Wavemaker Diagramm: Helical fraction gegen Schmelztemperatur

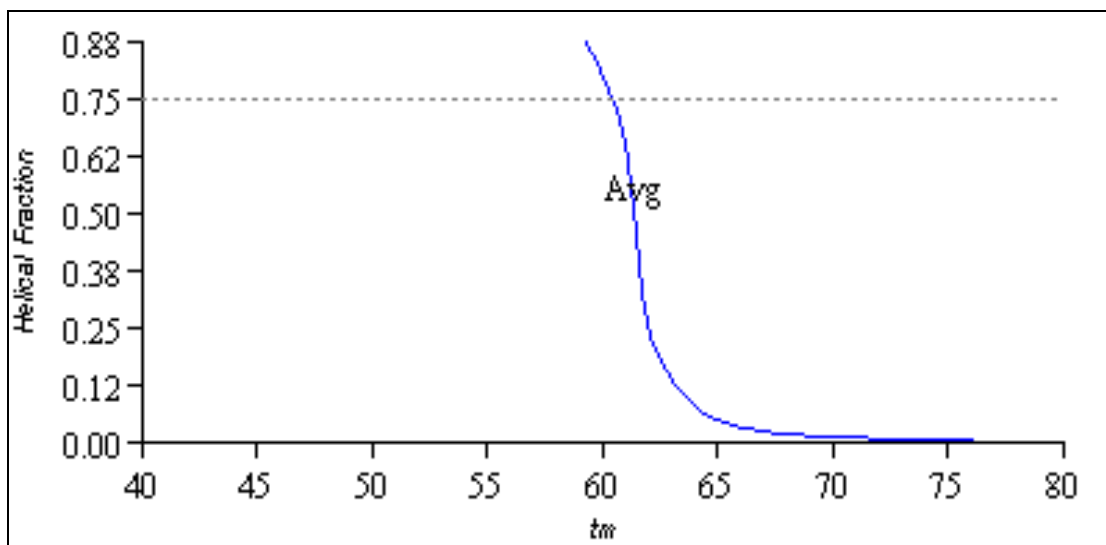
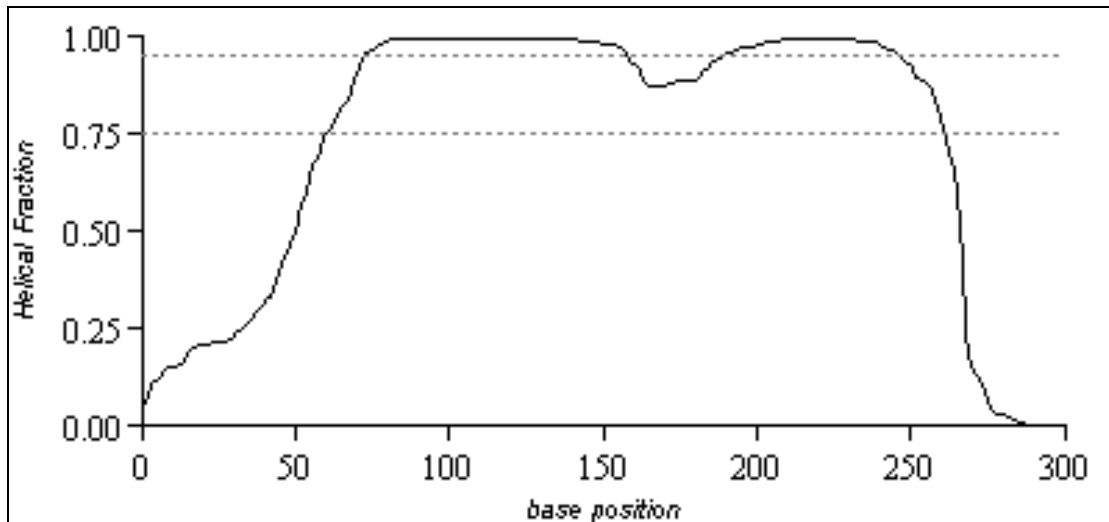


Abbildung 1: Wavemaker®-Diagramm: Helical fraction gegen Schmelztemperatur

Auf der Abbildung 1 ist die helical-fraction (Doppelsträngige DNA) eines PCR-Fragmentes (Fragment A) gegen die Temperatur aufgetragen. Das PCR-Fragment hat eine Schmelzdomäne. Die Wavemaker-Software schlägt eine Analysetemperatur von 60,4°C vor



**Abbildung 2: Wavemaker®- Diagramm Helical fraction gegen Basenposition**

Auf der der Abbildung 2 ist die helical fraction (doppelsträngige DNA) gegen die Basenposition aufgetragen. Das PCR-Fragment (Fragment A) ist über die gesamte Länge komplett aufgeschmolzen.

Im Folgenden sind die Pufferkonzentrationen und –verhältnisse für jedes Amplicon einzeln aufgeführt. Sie wurden von der Software automatisch errechnet.

Amplicon für Exon 1: Die Temperaturen der Schmelzdomänen liegen bei 65,8°C und 67,5°C. Für das Amplicon 1 wurde folgendes Programm für die DHPLC gewählt:

**Tabelle 6: DHPLC-Programm für Exon1**

Gradient Name	time(min)	%A	%B
Loading	0	50,5	49,5
Start Gradient	0,5	45,5	54,5
Stop Gradient	5	36,5	63,5
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibrate	5,7	50,5	49,5
Stop Equilibrate	6,6	50,5	49,5

Zu Beginn wird das PCR-Fragment zusammen mit einem Gemisch aus Puffer A (50,5%) und Puffer B (49,5%) in die Säule injiziert. Nach einer halben Minute verändert sich das Gemisch der Puffer: Puffer A hat noch einen Anteil von 45,5% und Puffer B einen Anteil von 54,5%. Nach 5 Minuten ist der Anteil von Puffer A auf 36,5% gesunken und der Anteil von Puffer B auf 63,5% gestiegen. In Puffer B ist 25% Acetonitril enthalten. Acetonitril stört die

Interaktion zwischen dem PCR-Fragment und der Säule. Steigt die Konzentration von Puffer B an, lösen sich Verbindungen zunehmend und die DNA-Doppelstränge können aus der Säule gewaschen werden.

Anschließend wird die Säule für eine halbe Minute mit 100% Puffer B gewaschen (Start Clean-Stop Clean). Danach wird sie wieder auf das Ausgangsverhältnis der Puffer eingestellt (Equilibriate).

Das Prinzip ist für alle Amplicons gleich. In Abhängigkeit von Nukleotidabfolge der PCR-Fragmente ändern sich die Gradienten. Bei den meisten Amplicons sind die Gradienten für beide Schmelzdomänen gleich. Nur in einzelnen Ausnahmen unterscheiden sich diese.

Amplicon für Exon 2: Die Temperatur der Schmelzdomänen liegen bei 63,7°C und 65,7°C.

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 7: DHPLC-Programm für Exon 2**

Gradient Name	time(min)	%A	%B
Loading	0	52,5	47,5
Start Gradient	0,5	47,5	52,5
Stop Gradient	5	38,5	61,5
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	52,5	47,5
Stop Equilibriate	6,6	52,5	47,5

Amplicon für Exon 3: Die Temperatur der Schmelzdomänen liegt bei 59,9°C

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 8: DHPLC-Programm für Exon 3 (1. Schmelzdomäne)**

Gradient Name	time(min)	%A	%B
Loading	0	49,1	50,9
Start Gradient	0,5	44,1	55,9
Stop Gradient	5	35,1	64,9
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	49,1	50,9
Stop Equilibriate	6,6	49,1	50,9

Für die zweite Schmelzdomäne des Amplicons von Exon 3 wurde ein anderes Programm benutzt als für die erste Schmelzdomäne: Die Temperatur der Schmelzdomäne liegt bei 61,2°C.

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 9: DHPLC-Programm für Exon 3 (2.Schmelzdomäne)**

Gradient Name	time(min)	%A	%B
Loading	0	51,1	48,9
Start Gradient	0,5	46,1	53,9
Stop Gradient	5	37,1	62,9
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	49,1	50,9
Stop Equilibriate	6,6	49,1	50,9

Für das Amplicon von Exon 4: Die Temperaturen der Schmelzdomänen liegen bei 58,2°C und 59,2°C.

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 10: DHPLC-Programm für Exon 4**

Gradient Name	time(min)	%A	%B
Loading	0	51,7	48,3
Start Gradient	0,5	46,7	53,3
Stop Gradient	5	37,7	62,3
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	51,7	48,3
Stop Equilibriate	6,6	51,7	48,3

Für das Amplicon von Exon 5: Die Temperaturen der Schmelzdomänen liegen bei 55,9°C und 59,3°C.

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 11: DHPLC-Programm für Exon 5**

Gradient Name	time(min)	%A	%B
Loading	0	50,5	49,5
Start Gradient	0,5	45,5	54,5
Stop Gradient	5	36,5	63,5
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	50,5	49,5
Stop Equilibriate	6,6	50,5	49,5

Für das Amplicon von Exon 6: Die Temperatur der ersten Schmelzdomäne liegt bei 57,6°C.

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 12: DHPLC-Programm für Exon 6 (1. Schmelzdomäne)**

Gradient Name	time(min)	% A	% B
Loading	0	50,2	49,8
Start Gradient	0,5	45,2	54,8
Stop Gradient	5	36,2	63,8
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	50,2	49,8
Stop Equilibriate	6,6	50,2	49,8

Für die zweite Schmelzdomäne des Amplicons von Exon 6 wurde ein anderes Programm benutzt als für die erste Schmelzdomäne: Die Temperatur der zweiten Schmelzdomäne liegt bei 60°C.

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 13: DHPLC-Programm für Exon 6 ( 2. Schmelzdomäne)**

Gradient Name	time(min)	% A	% B
Loading	0	52,2	47,8
Start Gradient	0,5	47,2	52,8
Stop Gradient	5	36,2	63,8
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	50,2	49,8
Stop Equilibriate	6,6	50,2	49,8

Für das Amplicon von Exon 7: Die Temperatur der einzigen Schmelzdomäne liegt bei 60,7°C.

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 14: DHPLC-Programm für Exon 7**

Gradient Name	time(min)	% A	% B
Loading	0	50,6	49,4
Start Gradient	0,5	45,6	54,4
Stop Gradient	5	36,6	63,4
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	50,6	49,4
Stop Equilibriate	6,6	50,6	49,4

Für das Amplicon von Exon 8: Die Temperaturen der Schmelzdomänen liegen bei 58,2°C und 59,6°C.



Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 15: DHPLC-Programm für Exon 8**

Gradient Name	time(min)	%A	%B
Loading	0	51,6	48,4
Start Gradient	0,5	46,6	53,4
Stop Gradient	5	37,6	62,4
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	51,6	48,4
Stop Equilibriate	6,6	51,6	48,4

Für das Amplicon von Exon 9: Die Temperaturen der Schmelzdomänen liegen bei 59°C und 60,7°C.

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 16: DHPLC-Programm für Exon 9**

Gradient Name	time(min)	%A	%B
Loading	0	51	49
Start Gradient	0,5	46	54
Stop Gradient	5	37	63
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	51	49
Stop Equilibriate	6,6	51	49

Für das Amplicon von Exon 10.1: Die Temperaturen der Schmelzdomänen liegen bei 58,6°C und 60,2°C.

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 17: DHPLC-Programm für Exon 10.1**

Gradient Name	time(min)	%A	%B
Loading	0	50,3	49,7
Start Gradient	0,5	45,3	54,7
Stop Gradient	5	36,3	63,7
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	50,3	49,7
Stop Equilibriate	6,6	50,3	49,7

Für das Amplicon von Exon 10.2: Die Temperaturen der Schmelzdomänen liegt bei 57,3°C und 61,1°C.

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 18: DHPLC-Programm für Exon 10.2**

Gradient Name	time(min)	%A	%B
Loading	0	50,8	49,2
Start Gradient	0,5	45,8	54,2
Stop Gradient	5	36,8	63,2
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	50,8	49,2
Stop Equilibriate	6,6	50,8	49,2

Für das Amplicon von Exon 11: Die Temperatur der einzigen Schmelzdomäne liegt bei 60,7°C.

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 19: DHPLC-Programm für Exon 11**

Gradient Name	time(min)	%A	%B
Loading	0	51,7	48,3
Start Gradient	0,5	46,7	53,3
Stop Gradient	5	37,7	62,3
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	51,7	48,3
Stop Equilibriate	6,6	51,7	48,3

Für das Amplicon von Exon 12: Die Temperatur der einzigen Schmelzdomäne liegt bei 59,1°C.

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 20: DHPLC-Programm für Exon 12**

Gradient Name	time(min)	%A	%B
Loading	0	49	51
Start Gradient	0,5	44	56
Stop Gradient	5	35	65
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	49	51
Stop Equilibriate	6,6	49	51

Für das Amplicon von Exon 13.1: Die Temperaturen der Schmelzdomänen liegen bei 57,2°C und 58,6°C.

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 21:DHPLC-Programm für Exon 13.1**

Gradient Name	time(min)	%A	%B
Loading	0	51,6	48,4
Start Gradient	0,5	46,6	53,4
Stop Gradient	5	37,6	62,4
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	51,6	48,4
Stop Equilibriate	6,6	51,6	48,4

Für das Amplicon von Exon 13.2: Die Temperaturen der Schmelzdomänen liegen bei 58,5°C und 61,8°C.

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 22: DHPLC-Programm für Exon 13.2**

Gradient Name	time(min)	%A	%B
Loading	0	51,6	48,4
Start Gradient	0,5	46,6	53,4
Stop Gradient	5	37,6	62,4
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	51,6	48,4
Stop Equilibriate	6,6	51,6	48,4

Für das Amplicon von Exon 14: Die Temperaturen der Schmelzdomänen liegen bei 59,3°C und 61,2°C.

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 23: DHPLC-Programm für Exon 14**

Gradient Name	time(min)	%A	%B
Loading	0	51,7	48,3
Start Gradient	0,5	46,7	53,3
Stop Gradient	5	37,7	62,3
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	51,7	48,3
Stop Equilibriate	6,6	51,7	48,3

Für das Amplicon von Exon 15: Die Temperatur der ersten Schmelzdomäne liegt bei 57,3°C.

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 24: DHPLC-Programm für Exon 15 (1. Schmelzdomäne)**

Gradient Name	time(min)	% A	% B
Loading	0	50,2	49,8
Start Gradient	0,5	45,2	54,8
Stop Gradient	5	36,2	63,8
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	50,2	49,8
Stop Equilibriate	6,6	50,2	49,8

Für die zweite Schmelzdomäne des Amplicons von Exon15 wurde ein anderes Programm benutzt als für die erste Schmelzdomäne: Die Temperatur der zweiten Schmelzdomäne liegt bei 63,1°C.

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 25: DHPLC-Programm für Exon 15 (2. Schmelzdomäne)**

Gradient Name	time(min)	% A	% B
Loading	0	52,2	47,8
Start Gradient	0,5	47,2	52,8
Stop Gradient	5	36,2	63,8
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	50,2	49,8
Stop Equilibriate	6,6	50,2	49,8

Für das Amplicon von Exon16: Die Temperaturen der beiden Schmelzdomänen liegen bei 59,8°C und 61,7°C.

Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 26: DHPLC-Programm für Exon 16**

Gradient Name	time(min)	% A	% B
Loading	0	48,1	51,9
Start Gradient	0,5	43,1	56,9
Stop Gradient	5	34,1	65,9
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibriate	5,7	48,1	51,9
Stop Equilibriate	6,6	48,1	51,9

Für die Überprüfung der Methode wurden Testläufe mit Negativproben durchgeführt (Proben bei denen bekannt ist, dass sie keine Mutationen haben). Für die Auswertung sind scharfe

Peaks mit einem klaren Signal wichtig. Idealerweise erscheinen diese zwischen der 3.Min und 5.Min nach Beginn der Injektion. Durch Veränderung der Puffergradienten konnte erreicht werden, dass sich die DNA-Doppelstränge früher oder später von der Säule lösen und dadurch der Zeitpunkt der Peaks sich verändert.

### 3.7.3 Ablauf der DHPLC

Vor jedem Lauf erfolgte ein „Hotwash“. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Säulenmatrix frei von Verunreinigungen war. Der „Hotwash“ lief bei einer Temperatur von 75°C. Außerdem wurde ein weiterer Puffer verwendet.

Folgendes Programm wurde benutzt:

**Tabelle 27: DHPLC-Programm für „Hotwash“**

Gradient Name	time(min)	%A	%B	%C
Loading	0	50	50	0
Start Gradient	0,1	0	0	100
Stop Gradient	15,1	0	0	100
Start Clean	15,2	0	0	100
Stop Clean	15,3	0	0	100
Start Equilibrate	15,4	50	50	0
Stop Equilibrate	46,4	50	50	0

Anschließend wurde mit zwei standardisierten Lösungen ( „Wave Low-Range Mutation Control Standard“ und dem “Wave High-Range Mutation Control Standard”) geprüft, ob die DHPLC korrekt arbeitet.

Für das Programm „High Standard“, welches bei 70°C lief, wurde folgendes Programm verwendet:

**Tabelle 28: DHPLC-Programm für „High Standard“**

Gradient Name	time(min)	%A	%B
Loading	0	53,3	46,7
Start Gradient	0,5	48,3	51,7
Stop Gradient	5	39,3	60,7
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibrate	5,7	53,3	46,7
Stop Equilibrate	6,6	53,3	46,7

Für das Programm „Low Standard“, welches bei 56°C lief, wurde folgendes Programm verwendet:

**Tabelle 29: DHPLC-Programm für „Low-Standard“**

Gradient Name	time(min)	%A	%B
Loading	0	53,8	46,2
Start Gradient	0,5	48,8	51,2
Stop Gradient	5	39,8	60,2
Start Clean	5,1	0	100
Stop Clean	5,6	0	100
Start Equilibrate	5,7	53,8	46,2
Stop Equilibrate	6,6	53,8	46,2

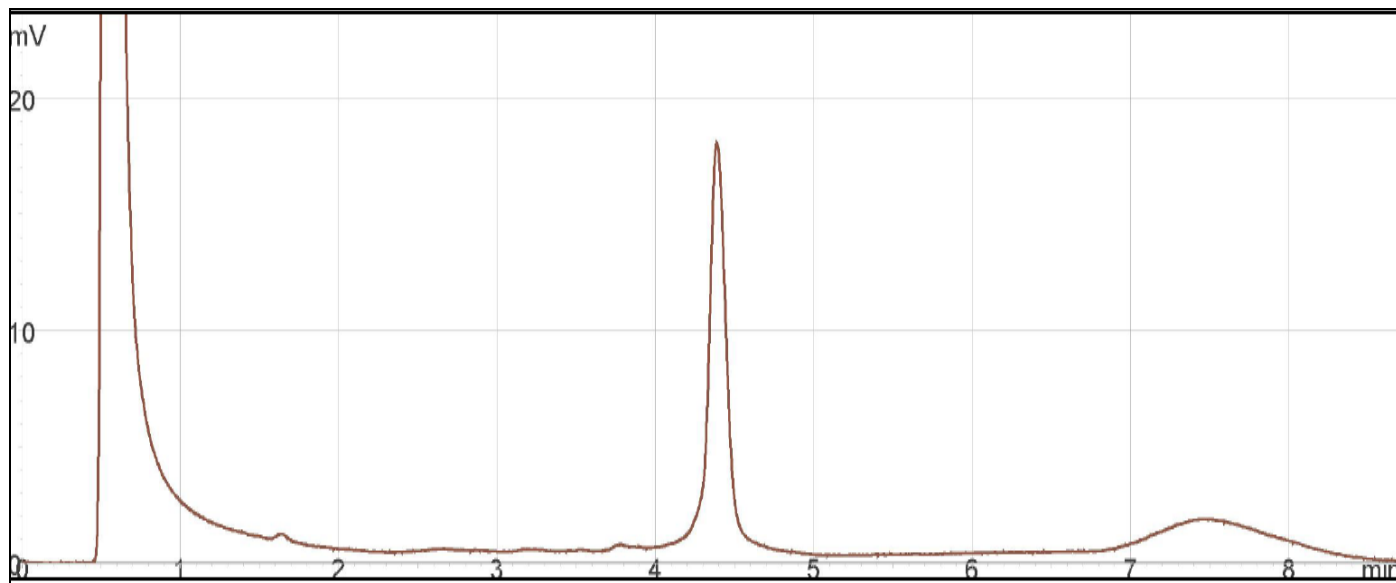
Für beide Standards wurde das gleiche Programm jeweils zweimal verwendet, einmal ohne und einmal mit injiziertem Standard. Beim ersten Mal wurde kein Standard injiziert, um die Säule auf Betriebstemperatur zu bringen. Danach wurden 5µl des Standards injiziert. Bei korrektem Verlauf zeigte die DHPLC zwei Doppelpeaks für jeden Standard an.

Anschließend wurde die DHPLC mit 5µl von den amplifizierten PCR-Produkten beladen und die Programme für jedes Amplicon wie oben beschrieben durchgeführt.

### 3.7.4 Deutung des Chromatogramms

Für das Ergebnis der DHPLC waren nur Peaks mit ausreichend scharfen Signalen (mind. 10mV) relevant. Da Amplicons mit Doppelpeaks auf genetische Veränderungen schließen ließen, wurden diese im nächsten Schritt sequenziert.

Primer und andere Nukleotide zeigen wechselwirken nur geringfügige Wechselwirkungen mit der Säule und eluieren deswegen bereits nach einigen Sekunden. Diese „Verunreinigungen“ erzeugen den hohen Peak direkt am Anfang des Chromatogramms. Breite Peaks bei 3 min konnten ignoriert werden. Diese stellen Verunreinigungen dar, die sich früh von der Säule lösen. Der Wash-off-Peak am Ende des DHPLC-Laufes wird ebenso durch Verunreinigungen erzeugt. Entscheidend ist der scharfe Peak zwischen der 3. und 5. Min.



**Abbildung 3: Chromatogramm**

Die Abbildung 3 zeigt ein Chromatogramm einer Homoduplex-DNA. Das Signal der UV-Lampe in mV ist gegen die Zeit aufgetragen. Deutlich zu sehen ist der Peak bei 4,5 min, der durch das PCR-Fragment entsteht.

### 3.8 Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung dient der Bestimmung der Nukleotid-Abfolge in einem PCR-Fragment. Das folgende Prinzip wurde erstmals von Sanger (Sanger et al., 1977) beschrieben. Es werden die gleichen Primer eingesetzt wie in der PCR. Allerdings wird jetzt nur ein Primer benutzt, um eine lineare Amplifizierung zu gewährleisten. Der Primer dient als Ausgang für das Enzym DNA-Polymerase. Dieses verlängert einen der beiden komplementären DNA-Stränge. Dem Ansatz sind Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTP), die mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, hinzugefügt.

Nachdem die DNA-Doppelhelix bei 95-98°C denaturiert wurde, kann die Polymerase die DNA-Stränge verlängern. Die ddNTPs besitzen keine 3'-Hydroxygruppe. Ihr Einbau in den DNA-Strang führt zum Abbruch der Reaktion, weil die OH-Gruppe am 3'-C-Atom für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids fehlt. Dadurch entstehen Nukleotidketten unterschiedlicher Länge, die aber alle mit einem der vier markierten ddNTPs enden. Mit Hilfe der Kapillargelelektrophorese werden die Abbruchprodukte der Länge nach aufgetrennt. Die Fluoreszenzfarbstoffe an den ddNTPs werden mit Hilfe einer Lasertechnologie angeregt und emittieren Wellenlängen, die über Detektoren aufgenommen

werden. Diese Signale werden mit einer Software in Sequenz-Elektropherogramme umgewandelt.

### 3.8.1 Aufreinigung der PCR-Amplifikate

Zur Exonuclease-Aufreinigung der PCR-Amplifikate wurde ein Exonuclease-Mix bestehend aus 15 µl Exonuclease, 70 µl SAP FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase und 90µl Aqua dest. hergestellt.

Von jedem PCR-Produkt wurden 2 x 5 µl Amplifikat in ein 8er 0,2ml PCR-Röhrchen SoftStrips pipettiert (jeweils für den Forward- und Reverse-Primer). Zu jedem der 5µl PCR-Amplifikate wurden 1,75 µl Exonuclease-Mix hinzugegeben.

Als Thermocycler wurde der MJ Research PTC 200 (BioRad) verwendet. In diesem Thermocycler lief folgendes Programm:

**Tabelle 30: Aufreinigung der PCR-Amplifikate**

	Temperatur	Zeit
Step 1	37°C	15min
Step 2	85°C	15min
Step 3	4°C	forever

### 3.8.2 Durchführung der Sequenzierung

Die Primer wurden für die Sequenzierung, anders als für die PCR (5 pmol/µl), auf eine Konzentration von 1 pmol/µl verdünnt.

Zu dem Exonuclease-PCR-Amplifikat (6,75µl) wurden die Forward- bzw. Reverse Primer (jeweils 2 µl) und der BigDye® Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (BDT Mix) (ebenfalls 2 µl) direkt hinzu pipettiert.

Anschließend fand die eigentliche Sequenzierungsreaktion im Thermocycler statt:



**Tabelle 31: Sequenzierungsreaktion**

	Temperatur	Zeit
Step 1	96°C	10 sec
Step 2	60°C	4 min
Step 3	Goto Step1	25 x
Step 4	4°C	forever

### **3.8.3 Aufreinigung der Sequenzierreaktion**

Die Aufreinigung der Produkte der Sequenzierreaktion erfolgte über Säulen. Die Säulen wurden gevortext und danach bei 4500 rpm (rounds per minute) für 1 Minute zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Säulen in neue Caps (kleine Plastikbehälter) überführt und pro Säule der gesamte Ansatz darauf pipettiert. Die Säulen wurden erneut bei 4500rpm für 1 Minute zentrifugiert. Die aufgereinigten Sequenzier-Reaktionen wurden bei 59°C und 1500rpm für 30Minuten getrocknet. Die Lyophilisate wurden in jeweils 12µl Hi-Di™- Formamide gelöst. Davon wurden 10µl auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und bei 1000rpm kurz anzentrifugiert. Danach wurden die Sequenzier-Reaktionen bei 98°C für 3 Minuten denaturiert. Anschließend wurde die Platte zur Analyse in den Sequenzierer gesetzt. Der Sequenzierer analysierte dann die Signale der markierten ddNTPs und errechnete daraus die Nukleotid-Abfolge der PCR-Amplifikate.

### **3.8.4 Auswertung der Sequenzierreaktion**

Zur Auswertung wurde sowohl für den Forward-Primer als auch den Reverse-Primer die Nukleotidsequenz erstellt. Dadurch war es möglich die Sequenz des Amplicons auf beiden Primersträngen zu vergleichen. Die Sequenz wurde mit der Referenzsequenz verglichen. In den Elektropherogrammen wurden mögliche Mutationen angezeigt. Veränderungen in der Nukleotidsequenz kommen auf beiden Strängen an der identischen Stelle vor.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Patientenkollektiv**

Es wurden 97 Patienten untersucht. 96 Patienten waren weiblich und ein Patient männlich. 85 Patienten waren einseitig an einem Mammakarzinom erkrankt. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe lag bei 52 Jahren. Das Alter der Erkrankten reichte von 26 Jahren bis 81 Jahren. Sechs Patienten waren beidseitig an einem Mammakarzinom erkrankt. Ihre Erstdiagnosen erfolgten in einem Alter von 30 Jahren bis 75 Jahren.

5 Patienten waren an einem Ovarialkarzinom erkrankt. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 48 Jahren. Das Alter der Erkrankten reichte von 26 Jahren bis 60 Jahren.

Eine Patientin war zum Zeitpunkt der Entnahme der Blutprobe gesund, hatte jedoch ein hohes Risiko und in der Familie stand für die Testung keine lebende Indexpatientin zur Verfügung. Sie war 44 Jahren alt.

### **4.2 Tumorentitäten**

Insgesamt waren 60 Patientinnen ein- oder beidseitig an DBC erkrankt. Das Durchschnittsalter betrug 51,1 Jahre und die Altersspanne reichte von 26 bis 77 Jahre. Davon hatten 45 eine positive Familienanamnese für ein Magenkarzinom. Bei 15 Patienten blieb die Familienanamnese negativ.

Neun Frauen waren ein- oder beidseitig an LBC erkrankt. Hier lag das Durchschnittsalter bei 62 Jahre und das Alter der Erkrankung reichte von 38 Jahre bis 81 Jahre. In sieben Familien gab es ein Magenkarzinom. In zwei Familien wurden keine Magenkarzinome diagnostiziert.

Sechs Frauen und ein Mann waren an anderen Tumorentitäten wie zum Beispiel einem phylloiden oder papillären Mammakarzinom erkrankt. Von diesen hatte eine Patientin eine positive Familienanamnese für ein Magenkarzinom. Bei Diagnosestellung waren die Frauen zwischen 41 und 62 Jahre alt mit einem Durchschnittsalter von 52 Jahren.

Insgesamt fünf Frauen waren an einem Ovarialkarzinom erkrankt. Alle hatten eine positive Familienanamnese für Magenkarzinome.

### 4.3 Genetische Veränderungen und Tumorentitäten

18 Patientinnen mit DBC hatten einen Polymorphismus, davon hatten 13 eine positive Familienanamnese für ein Magenkarzinom. Bei fünf Frauen wurden zwei Polymorphismen festgestellt, davon hatten drei eine positive Familienanamnese. Bei 37 Frauen mit DBC konnten keine Veränderungen im *CDHI*-Gen festgestellt werden.

Die Auswertung ergab für die Patientinnen mit LBC sechs Fälle von einem Polymorphismus (fünf mit positiver Familienanamnese für Magenkarzinome) und drei Fälle ohne Polymorphismen.

In der Gruppe mit anderen Mammakarzinomentitäten gab es drei Frauen mit einem Polymorphismus, eine Frau mit drei Polymorphismen, zwei ohne Polymorphismen und eine VUS (variant of unknown significance).

Für die Gruppe mit unbekannter Histologie war eine Frau mit einem Polymorphismus diagnostiziert, sechs mit zwei Polymorphismen, eine mit mehr als drei Polymorphismen. Sieben wiesen keine Polymorphismen auf. Die gesunde Patientin war mit einer VUS diagnostiziert worden.

**Tabelle 32: Patientenkollektiv**

	96 Frauen und ein Mann aus 97 Familien mit erblichem HBOC												Summe
	Ovarialkarzinom		Mammakarzinom (ein- oder beidseitig)								Gesund		
n =	5		91								1		97
Histol. Subtyp			DBC		LBC		Andere Histologie		Unbek. Histologie				
Familienanamnese mit Magenkarzinom	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	
n =	5	0	45	15	7	2	1	6	11	4	0	1	97
UV <i>CDH1</i> n =	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2
Frauen mit 1 <i>CDH1</i> Polymorphismus n =	1	0	13	5	5	1	1	2	1	0	0	0	29
Frauen mit 2 <i>CDH1</i> Polymorphismen n =	1	0	3	2	0	0	0	0	4	2	0	0	12
Frauen mit 3 <i>CDH1</i> Polymorphismen n =	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	3
Frauen ohne <i>CDH1</i> polymorphism n =	2	0	29	8	2	1	0	2	6	1	0	0	51
UV= unknown variant (unklare variante); BP= Basenpaare N = number (Anzahl)													

## 4.4 Polymorphismen und Mutationen

Insgesamt wurden 10 Veränderungen des Genoms gefunden. Drei Veränderungen (c.48+6 T>C, c.531+10G>C, c.1937-13 T>C) liegen in den intronischen Bereichen in der Nähe zu den Exonen. Sieben Veränderungen betreffen die Exone. Davon haben fünf keinen Einfluss auf die Proteinstruktur von *CDH1*: c.345G>A, c.1224G>A, c.2076T>C, c.2292C>T. Zwei

Veränderungen betreffen die Proteinstruktur: c.1774G>A;p.Ala592Thr, c.2512A>G;p.Ser838Gly.

#### 4.4.1 Intronische Veränderungen

19mal wurde die Veränderung c.48+6 T>C gefunden. In der Datenbank ClinVar (ClinVar - National Center for Biotechnology Information) wird die Veränderung als c.48+6 C>T (RCV000132163.2) angegeben. Bei neueren Datenbanken wird allerdings T als Hauptallel geführt. Deshalb wird in dieser Arbeit die Veränderung als c.48+6 T>C aufgeführt.

Sechsmal wurde die Veränderung c.531+10G>C (RCV000132274.1) gefunden. In ClinVar wird sie als benigne eingestuft.

16 Mal wurde die Veränderung c.1937-13 T>C (RCV000128989.1) gefunden. In ClinVar wird sie als benigne eingestuft.

Bei ClinVar handelt es sich um eine Datenbank in der genomische Variationen und deren Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit gespeichert sind.

**Tabelle 33: Intronische Veränderungen**

Mutation	Häufigkeit	Aminosäureshift	Dignität
c. 48+6 T>C	19	kein	benign
c.531+10 G>C	6	kein	benign
c.1937-13 T>C	16	kein	benign

#### 4.4.2 Veränderungen im nicht-codierenden Bereich

Bei fünf Patienten gibt es im Bereich von Exon 1, welcher nicht zur codierenden Sequenz gehört, Veränderungen. Vier Patienten haben die Veränderung c.-71 C>G (RCV000205917.1) und ein Patient hat die Veränderung c.-54 C>G (RCV000204309.1).

Im nicht codierenden Abschnitt von Exon16 gibt es 28 Mal die Veränderung c.2649+57 C>T (keine Angaben bei ClinVar).

Alle Veränderungen können als benigne angesehen werden.

**Tabelle 34: Veränderungen im nicht codierenden Bereichs**

Mutation	Häufigkeit	Aminosäureshift	Dignität
c.-71 C>G	4	kein	keine Angaben
c.-54C>G	1	kein	keine Angaben
c. 2649+57 C>T	28	kein	keine Angaben

#### **4.4.3 Veränderungen im codierenden Bereich**

Einmal wurde die Veränderung c.345 G>C (keine Angaben bei ClinVar) bei einer Frau, die mit 58 Jahren an DBC erkrankt war, gefunden. Ihr Vater war mit 61 Jahren an einem Mammakarzinom erkrankt. Ihr Großvater mütterlicherseits war mit 56 Jahren an einem Magenkarzinom erkrankt. Splicevorhersageprogramme geben keinen Hinweis für eine Alteration des Spliceprodukts. Insofern kann diese Veränderung als „likely benign“ angesehen werden.

Einmal wurde die Veränderung c.1224 G>A (RCV000163128.1) gefunden. Die Patientin war mit 48 Jahren an einem Mammakarzinom mit unbekannter Histologie erkrankt. In der Familie war kein Fall von einem Magenkarzinom bekannt. Bei ClinVar wird sie als „likely benign“ eingestuft.

Drei Mal wurde die Veränderung c.2076 T>C (RCV000132164.2) gefunden. Weitere neun Proben zeigten in der DHPLC identische Peaks. Sie wurden nicht sequenziert, da die Veränderung nicht mutagen und somit nicht pathologisch ist. Vier Patientinnen waren am DBC erkrankt. Davon hatten drei Verwandte mit einem Magenkarzinom. Bei fünf Patientinnen war die Histologie des Mammakarzinoms unbekannt. Von diesen fünf Frauen hatten drei Verwandte mit einem Magenkarzinom. Zwei Patientinnen waren am Karzinom des Ovars erkrankt. In beiden Familien gab es Magenkarzinome. Eine Patientin war am intrazystischen Karzinom der Brust erkrankt. In ihrer Familie war kein Magenkarzinom bekannt. Bei ihr wurde auch die Veränderung c.2292 C>T gefunden s.u..

Fünf Mal wurde die Veränderung c.2253 C>T (RCV000130998.2) gefunden. Vier Patienten waren im Alter von 26 Jahren bis 63 Jahren an DBC erkrankt. Drei von ihnen hatten Verwandte ersten und zweiten Grades, die an einem Magenkarzinom erkrankt waren. Bei der Patientin, die bereits mit 26 Jahren an einem Mammakarzinom erkrankt war, war die

Familienanamnese für ein Magenkarzinom leer. Die fünfte Patientin mit der Mutation c.2253 C>T war beidseits im Alter von 52 Jahren an LBC erkrankt. Ihre Mutter war mit 61 Jahren an einem Magenkarzinom erkrankt. In ClinVar wird die Veränderung als „benign“ eingestuft. Zweimal wurde die Veränderung c.2292 C>T (RCV000124183.4) gefunden. Die erste Patientin war mit 46 Jahren an einem DBC erkrankt. In ihrer Familie waren keine Magenkarzinome bekannt. Die zweite Patientin wurde bereits oben beschrieben. In ClinVar wird die Veränderung als „benign/likely benign“ eingestuft.

**Tabelle 35: Veränderungen im codierenden Bereich**

Mutation	Häufigkeit	Aminosäureshift	Dignität
c.345G>C	1	kein	keine Angaben
c.1224 G>A	1	kein	likely benign
c.2076 T>C	3 und 9 mal wahrscheinlich	kein	benign
c.2253 C>T	5	kein	benign
c.2292 C>T	2	kein	benign/likely benign

#### 4.4.4 Mutagene Veränderungen

Zwei Mutationen verändern die Struktur der Aminosäuresequenz: c.1774 G>A, p. Ala592Thr (RCV000115846.4) und c.2512 A>G (RCV000115857.5), p.Ser838Gly.

Die Patientin mit der Mutation c.1774 G>A war mit 38 Jahren an DBC erkrankt. Ihr Vater erkrankte mit 68 Jahren an einem Prostatakarzinom und mit 72 Jahren an einem Mammakarzinom. Ihr Großvater väterlicherseits war mit 35 Jahren an einem Magenkarzinom erkrankt. Die Großmutter väterlicherseits war mit 62 Jahren an einem Unterleibskarzinom erkrankt. Der Großvater mütterlicherseits war mit 72 Jahren an einem Rippenfellkarzinom erkrankt.

Bei dieser Mutation wird die Base Guanin durch die Base Adenin substituiert. In der Folge verändert sich die Aminosäuresequenz. An Position 592 wird die nicht polare Aminosäure Alanin durch die polare Aminosäure Threonin substituiert. Die Grantham difference wird mit

58 und die SIFT prediction mit „damaging“ bei HGMD (The Human Gene Mutation Database) angegeben. Die Kyte-Doolittle Hydrophobizität sinkt von 1,8 auf -0,7. Neuere Ergebnisse aus der Datenbank ClinVar und dem Mutationsanalyseprogramm Alamut zeigen jedoch, dass es sich hierbei eher um einen Polymorphismus handelt.

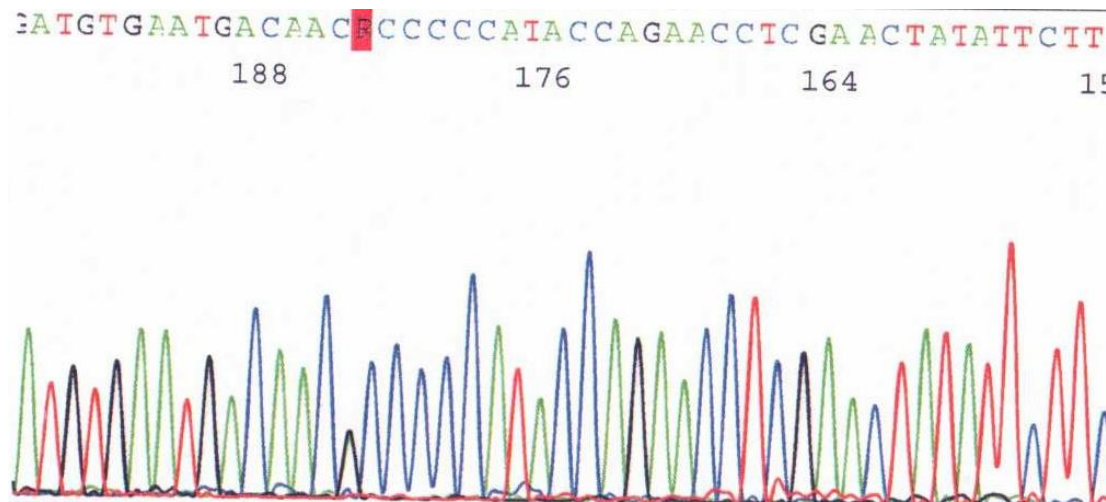


Abbildung 4: Elektropherogramm zu c.1774 G>A, p. Ala592Thr

Die Patientin mit der Mutation c.2512 A>G war zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht erkrankt. Ihre Mutter ist mit 29 Jahren an einem Ovarialkarzinom und mit 40 Jahren an einem Mammakarzinom erkrankt. Ihr Vater erkrankte mit 70 Jahren an einem Leberkarzinom. Eine Cousine und Tante mütterlicherseits sind mit 39 Jahren und 48 Jahren an einem Ovarialkarzinom erkrankt. Die Cousine ist außerdem mit 41 Jahren an einem Mammakarzinom erkrankt. Ihre Großmutter mütterlicherseits ist mit 60 Jahren an einem Mammakarzinom sowie im unbekannten Alter an einem Magen- o. Unterleibskarzinom erkrankt. Ihr Großvater mütterlicherseits ist mit 77 Jahren an einem Bronchialkarzinom erkrankt. Bei dieser Mutation wird Base Adenin durch die Base Guanin ersetzt. In der Folge verändert sich die Aminosäuresequenz. An Position 838 wird die neutrale Aminosäure Glycin gegen die aliphatische Aminosäure Glycin ausgetauscht. Bei HGMD werden zu dieser Mutation keine Angaben gemacht. Bei ClinVar wird diese Veränderung als möglicherweise pathogen für Ovarialkarzinome beschrieben.

Die Indexpatientin ist negativ auf BRCA1/2-Mutationen getestet. Es gibt aber in der Familie positive Mutationsträger.



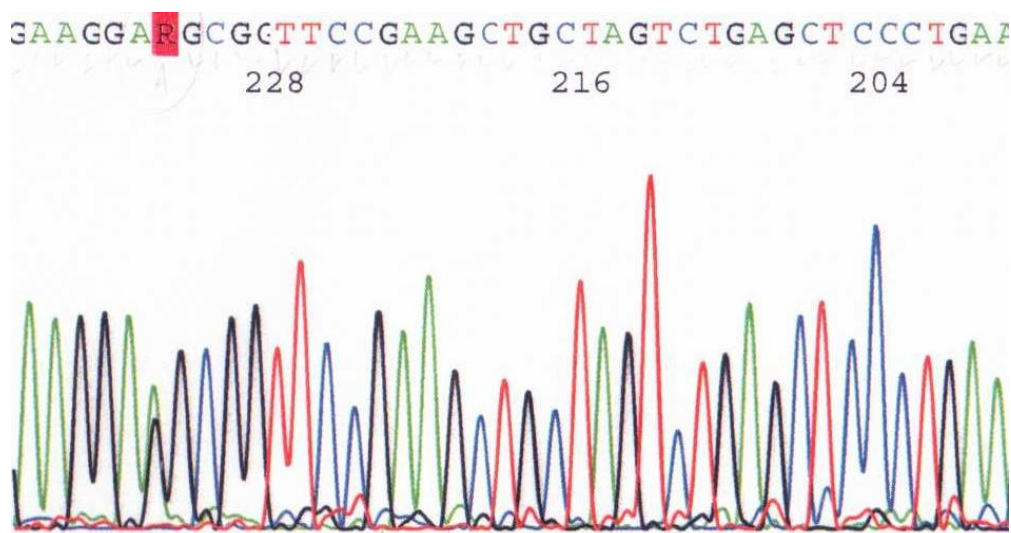


Abbildung 5: Elektropherogramm zu c.2512 A>G, p.Ser838Gly

Tabelle 36: Patienten mit genomischen Veränderungen, die die Aminosäurestruktur betreffen

Histologie	ED	Verw.: Magenkarzinom	ED: Magenkarzinom	Veränderungen in <i>CDH1</i>
duktal	38J	Großvater väterl.	35J	c.1774 G>A
gesund	gesund	Großmutter mütterl. Magen-o. Unterleibskarzinom	unbekannt	c.2512 A>G

**Tabelle 37: : Übersicht über die genomischen Veränderungen**

Mutation	Häufigkeit	Aminosäureshift	Dignität
c.1774 G>A	1	p.Ala592Thr	Likely benign
c.2512 A>G	1	p.Ser838Gly	Conflicting interpretations of pathogenicity

#### **4.4.5 Mutationen bei Patienten mit lobulären Mammakarzinomen**

Drei Patienten zeigten keine Veränderung. Bei drei Patienten wurde die Veränderung c.48+6 C>T gefunden. Eine Patientin hatte die Veränderung c.531+10G>C. Eine Patientin hatte jeweils die Veränderung c.1937-13T>C und c.2649+57C>T. Eine Patientin hatte die Veränderung c.2253 C>T und c.2649+57C>T. Die Auswirkungen der Veränderungen wurden schon zuvor beschrieben, sodass in dieser Subgruppe keine mit der Erkrankung assoziierte Veränderung im CDH1-Gen gefunden werden konnte.

**Tabelle 38: Mutationen bei Patienten mit LBC**

Histologie	ED	Familie mit Magenkarzinomen	ED: Magenkarzinom	Veränderungen in <i>CDH1</i>
lobulär	73	Großvater, mütterl.	unbekannt	c.48+6 C>T
lobulär	43	Vater	71	c.531+10 G>C
lobulär	55	Onkel mütterl.	55	negativ
lobulär	62	keine	keine	c.1937-13T>C, c.2649+57C>T
lobulär	61	Vater	44	negativ
lobulär	59	Vater Magen	68	c.48+6 C>T
lobulär, bds	38 u. 38	Onkel mütterl.	65	c.48+6 C>T
lobulär	81	keine	keine	negativ
lobulär, bds	52 u 52	Mutter	61	c.2253 C>T, c. 2649 + 57 C>T

ED= Erstdiagnose

#### 4.5 Doppelpeaks im Chromatogramm ohne nachweisbare Veränderung

Die DNA-Sequenz von Exon 1 einer Patientin zeigte im Chromatogramm der DHPLC Doppelpeaks an. Im Elektropherogramm konnten aber keine Veränderungen des Exons nachgewiesen werden, weder im Forward- noch im Reverse-Strang.

Bei vier weiteren DNA-Sequenzen von Exon 13.2 zeigten die Chromatogramme Doppelpeaks an. Im Forward-Strang konnten Mutationen in der codierenden Sequenz sicher ausgeschlossen werden. Der Reverse-Strang zeigte keine klare DNA-Sequenz und konnte daher zur Verifizierung nicht benutzt werden. Zwei weitere Proben zeigten die gleichen Peaks im Chromatogramm, wurden aber nicht sequenziert.

#### 4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Von den 97 Patientwn hatten 69 eine positive Familienanamnese für Magenkarzinome (negativ n= 28). Alle fünf an einem Ovarialkarzinom erkrankten Frauen hatten eine positive Familienanamnese. In 75% und 78% der an DBC bzw. LBC erkrankten Frauen wiesen eine positive Familienanamnese für Magenkarzinome auf. Bei 29 Probanden wurde eine Veränderung, bei 12 Probanden zwei Veränderungen und bei drei Probanden drei

Veränderungen in *CDH1* gefunden. Bei 51 Probanden konnten keine Veränderungen nachgewiesen werden. Bei 55% der an LBC und 27% der an DBC erkrankten Frauen wurden Veränderungen nachgewiesen.

**Tabelle 39: Klinische und genetische Übersicht über 46 Probanden, die ein bis drei Veränderungen haben**

Genotyp	Phenotyp						Gesamt- zahl der Ver- änderungen	Allel- frequenz <sup>1</sup>
	<i>DBC</i> (n=60)	<i>LBC</i> (n=9)	Andere (n=7)	Un- bekannt (n=15)	OvCa (n=5)	Gesund (n=1)		
c.48+6C>T #	10	3	2	3	1	0	19	0,8769
c.1937-13T>C #	6	1	1	6	2	0	16	0,1369
c.2076T>C #	4	0	1	5	2	0	12	0,6241
c.531+10G>C #	2	1	1	1	1	0	6	0,0538
c.2253C>T##	4	1	0	0	0	0	5	0,02381
c.2292C>T #/##	1	0	1	0	0	0	2	0.002008
c.345G>A#	1	0	0	0	0	0	1	0,004516
c.1224G>A	0	0	0	1	0	0	1	5.993e-05
c.1774G>A; p.Ala592Thr	1	0	0	0	0	0	1	0,004375
c.2512A>G; p.Ser838Gly	0	0	0	0	0	1	1	5.994e-05
OvCa= Ovarialkarzinom								
# In ClinVar wird diese Alteration als benigne angegeben;								
## In ClinVar wird diese Alteration als „likely benign“ angegeben								
1 (European (not Finnish)) nach ExAC Browser (Lek et al., 2016)								

## 5 Diskussion

### 5.1 Vergleich von Familien mit hereditärem diffusen Magenkarzinom und Familien mit gehäuften Mamma- und Magenkarzinomen

Ziel der Arbeit war es herauszufinden, ob es neben Familien mit einem hereditären diffusen Magenkarzinom, in denen gehäuft LBC und diffuse Magenkarzinome vorkommen, auch in Familien mit vermehrtem Auftreten von Mamma- und Magenkarzinomen, die nicht die strengen Diagnosekriterien des hereditären diffusen Magenkarzinomyndrom erfüllen, eine vermehrte Häufung von Mutationen in *CDH1* gibt. Dazu wurden mithilfe von PCR, DHPLC und Sanger-Sequenzierung 97 Patienten auf Mutationen im Gen *CDH1* getestet. Von den 97 Patienten waren 91 an einem Mammakarzinom erkrankt, davon sechs beidseits. Fünf Patientinnen waren an einem Ovarialkarzinom erkrankt und eine Patientin war gesund.

Insgesamt waren neun Frauen an LBC erkrankt, zwei davon beidseits. Damit sind in dieser Studie 9,8% der Mammakarzinom-Patienten an einem LBC erkrankt. Das entspricht in etwa der Erkrankungshäufigkeit von 10-15% bei allen an einem Mammakarzinom erkrankten Frauen (Sagara et al., 2015). Das Erkrankungsalter liegt zwischen 38 und 81 Jahren. Im Durchschnitt sind die Frauen mit 58,2 Jahren erkrankt

Vier Frauen hatten Verwandte ersten Grades mit einem Magenkarzinom in der Familie. Bei drei Frauen waren Verwandte zweiten Grades an einem Magenkarzinom erkrankt und zwei Frauen hatten gar keine Verwandten mit einem Magenkarzinom. Die Histologie aller beschriebenen Magenkarzinome ist unbekannt. Das Erkrankungsalter der Verwandten mit einem Magenkarzinom liegt zwischen 44 und 71 Jahren (mittleres Erkrankungsalter 59,2 Jahre). Keine der Familien erfüllt die Kriterien für ein hereditäres, diffuses Magenkarzinom.

Nach den neuen Richtlinien von 2015 zum hereditären, diffusen Magenkarzinom müssen folgende Kriterien erfüllt sein (van der Post et al., 2015):

- 1) Mindestens zwei Fälle eines Magenkarzinoms unabhängig vom Alter, eines davon ist ein diffuses Magenkarzinom
- 2) Ein Fall von diffusem Magenkarzinom im Alter unter 40 Jahren
- 3) Ein Familienmitglied ist an diffusem Magenkarzinom und LBC erkrankt, eins davon im Alter unter 50 Jahren

Da bei keiner Familie die Histologie der Magenkarzinome bekannt ist, kann in keiner Familie die Diagnose hereditäres diffuses Magenkarzinom gestellt werden. Auch das hohe Alter der Erstdiagnose bei den Magenkarzinomen, und mit einer Ausnahme bei den lobulären Mammakarzinomen, spricht gegen die hereditäre Form des Magenkarzinoms in diesen Familien.

Abgesehen von einigen nicht mutagenen Veränderungen konnte bei den Indexpatienten aus diesen Familien keine Mutation im Gen *CDH1* nachgewiesen werden.

Nach den bisherigen Richtlinien von 2010 lag die Mutationsrate für *CDH1* in Familien mit hereditärem diffusen Magenkarzinom zwischen 10-18% (van der Post et al., 2015, Benusiglio et al., 2013, Hansford et al., 2015).

Im Gegensatz dazu zeigt diese Studie, dass in Familien mit gehäuften Fällen von Mamma- und Magenkarzinomen die Auftretenswahrscheinlichkeit von Mutationen in *CDH1* nicht gehäuft ist. In der gesamten Kohorte wurde nur eine potentiell mutagene Veränderung gefunden (1% der Fälle). Die Mutationsrate entspricht damit denen in der Literatur veröffentlichten 1% aller Mutationen für *CDH1* bei Mammakarzinomen (Euhus, 2014). Auch in der Studie von Kraus et al. wurden bei 581 Individuen mit Brust- und/oder Ovarialkarzinom nur die *CDH1*-Veränderung c.2440-6 C>G gefunden. Diese Veränderung wurde als seltener Polymorphismus eingestuft (Kraus et al., 2017).

Aufgrund der niedrigen Rate von Mutationen kann eine Testung auf *CDH1*-Mutationen grundsätzlich nur in Familien empfohlen werden, die die Kriterien des hereditären diffusen Magenkarzinomsyndroms erfüllen.

Trotzdem gibt es einige Situationen, in denen die Testung auf *CDH1* sinnvoll ist (van der Post et al., 2015):

- 4) Beidseitiger LBC oder familiärer LBC in zwei oder mehreren Fällen unter 50 Jahren
- 5) Ein Familienmitglied hat eine Lippen-, Kiefer-, Gaumenspalte und ist an diffusem Magenkarzinom erkrankt
- 6) Nachweis von Siegelringzellen im pathologischen Präparat des Magens

Frauen unter 50 Jahren mit beidseitigem lobulären Mammakarzinom ohne ein diffuses Magenkarzinom in der familiären Vorgeschichte haben ein erhöhtes Risiko Trägerin einer *CDH1*-Mutation zu sein. Trägerinnen einer Mutation sind im Durchschnitt jünger als solche ohne Mutation (Petridis et al., 2014). Daher sollten Frauen unter 50 Jahre mit einem beidseitigen lobulären Mammakarzinom auf eine Mutation in *CDH1* getestet werden.

Die einzige Patientin unter 50 Jahre mit beidseitigem lobulären Mammakarzinom in dieser Studie wurde negativ auf eine *CDH1*-Mutation getestet. Die zweite Patientin mit beidseitigem

lobulären Mammakarzinom war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 52 Jahre alt und damit etwas über der Altersgrenze zur Empfehlung einer Testung auf *CDHI*-Mutationen. Auch bei ihr wurde keine Mutation gefunden. Mutationen in anderen Genen könnten bei den beiden Frauen eine mögliche Rolle spielen und bieten Ansatz für weitere Forschung. In der Anamnese sollte auch gezielt nach hormoneller Ersatztherapie als weiterer möglicher Grund für die Erkrankung nachgefragt werden. Östrogene stellen ein besonderes Risiko für LBC dar (Dossus and Benusiglio, 2015).

Es gibt beschriebene Fälle von *CDHI*-Mutationsträgerinnen, bei denen dem diffusen Magenkarzinom ein LBC vorausgegangen ist (Benusiglio et al., 2013). LBC könnte daher eine Art „Früherkennung“ für das diffuse Magenkarzinom angesehen werden. Dabei ist die Penetranz von *CDHI*-Mutationen für das diffuse Magenkarzinom nahezu 100% (Benusiglio et al., 2013).

Deshalb sollten sich besonders Frauen, die in jungem Alter (unter 50 Jahren) an LBC erkranken, weiteren diagnostischen Maßnahmen unterziehen. Makroskopisch lässt sich das diffuse Magenkarzinom nicht feststellen, so dass ein Endoskopie-Screening überflüssig ist (Fujita et al., 2012, Hebbard et al., 2009). Den Trägern einer *CDHI*-Mutation wird daher die prophylaktische Gastektomie empfohlen, um den letalen Folgen eines diffusen Magenkarzinoms zu entgehen (Rogers et al., 2008, Dossus and Benusiglio, 2015).

In der Literatur gibt es beschriebene Fälle von Familien mit *CDHI*-Mutationen mit positiver Familienanamnese von LBC, aber keine Fälle von DBC. Huhyn et al. haben über eine Familie mit einer *CDHI*-Mutation berichtet, die in drei Generationen nachgewiesen werden konnte. DBC wurde in dieser Familie nicht nachgewiesen (Huynh and Laukaitis, 2016). Xie et al. berichten über zwei Familien mit nachgewiesenen *CDHI*-Mutationen und einer Vielzahl von LBC, aber ohne DBC (Xie et al., 2011). Trotzdem werden *CDHI*-Mutationen in Familien ohne DBC nicht erwartet. Deshalb werden genetische Testungen selten durchgeführt und mögliche pathologische Mutationen übersehen.

Vor dem Hintergrund sinkender Kosten im Rahmen der Panel-Testung und immer schnellerer Testergebnisse, kann eine Testung auf *CDHI*-Mutationen sinnvoll sein, um eine hohe Mortalität einer unentdeckten *CDHI*-Mutation zu vermeiden.

Zusätzliche genetische Informationen können bei gesunden Probanden zur Einschätzung von genetischen Risiken und bei Patienten zur Optimierung der Therapie genutzt werden (Stuebs et al., 2017).

## 5.2 Familien mit duktalem Brust- und Magenkarzinomen

Mit 60 von insgesamt 97 Patienten war die große Mehrheit einseitig an einem BDC erkrankt. In 45 Familien der an DBC erkrankten Patienten gab es ein Magenkarzinom (75%). In 15 Familien waren keine Magenkarzinome bekannt.

Zwei Patientinnen erkrankten beidseits an einem Mammakarzinom im Alter von 30 Jahren und 34 Jahren bzw. von 43 Jahren und 75 Jahren. Bei der erst genannten Patientin erkrankte der Großvater mit 68 Jahren, bei der zweiten die Mutter mit 59 Jahren an einem Magenkarzinom.

Eine Patientin mit einem DBC wurde positiv auf die Veränderung c.1774 G>A; p.Ala592Thr (clinvar: hereditary cancer-predisposing syndrome RCV000115846.4; breast cancer RCV000148453.1) getestet.

Sie war mit 38 Jahren sehr früh an einem Mammakarzinom erkrankt und hatte einen Großvater, der mit 35 Jahren ebenfalls sehr früh an einem Magenkarzinom erkrankt war. Die Patientin ist negativ für BRCA1/2-Mutationen getestet worden.

Obwohl die Mutation einen Aminosäureshift zur Folge hat, wird sie in ClinVar und Alamut eher als Polymorphismus bzw. Class 3 VUS eingestuft. Bei ClinVar sind dazu sieben Beiträge mit unterschiedlichen Einschätzungen erschienen. Deshalb ist es schwierig zu sagen, welchen Einfluss die Veränderung tatsächlich auf eine mögliche Erkrankung hat. Eine Fehleinstufung der Pathogenität der Veränderung kann schwere Folgen für die betroffenen Personen und deren Familien haben (Eccles et al., 2015b). Eine Class 3 VUS hat eine Wahrscheinlichkeit von 0.05-0.949 pathogen zu sein (Eccles et al., 2015a). Aufgrund der weiten Spanne von 5%-95% ist es fast unmöglich solche genetischen Veränderungen sicher einzuschätzen. Wenn keine weiteren Informationen vorliegen, wird sowohl die Risikoeinschätzung als auch die Therapie an der familiären Häufung der Tumorentität orientiert (Cheon et al., 2014).

Sowohl die Patientin als auch ihr Großvater sind beide sehr früh (<40 Jahre) an einem Tumor erkrankt. Das frühe Erkrankungsalter spricht für eine Mutation. Allerdings sind keine Mutationen in *CDH1* mit DBC verknüpft. Beim Magenkarzinom ist die Histologie unbekannt. Sollte es sich bei dem Magenkarzinom um einen diffusen Typ handeln, könnte dies mit der Mutation zusammenhängen. Da die Mutation nicht eindeutig eingestuft werden kann (s.o.), ist dies unwahrscheinlich. Somit ist die Mutation wahrscheinlich nicht die Ursache der Tumorerkrankungen.

Möglicherweise spielen in dieser Familie andere genetische Ursachen oder z.B. Lifestyle-Faktoren eine Rolle.



An dieser Stelle soll noch einmal darauf aufmerksam gemacht werden, dass anhand der vorliegenden Veränderung keine suffiziente Therapieempfehlung gegeben werden kann. Polymorphismen bzw. Class 3 VUS geben keine klare Indikation darüber, ob ein höheres Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms vorliegt oder nicht. Weitere Studien sind nötig, um zu entscheiden, ob das Risiko erhöht ist und wann eine Therapie begonnen werden sollte (Cheon et al., 2014).

### **5.3 Zusammenhang der familiären Häufigkeit zwischen unterschiedlichen Entitäten von Mammakarzinomen und Magenkarzinomen**

In einer von Chickman et al. veröffentlichten Studie wurden 1.167 Frauen mit einem lobulären oder duktalem Mammakarzinom bezüglich der Häufigkeit von einem Magenkarzinom in der Familie untersucht. In Familien mit LBC gab es in 37,8% der Fälle eine maligne Erkrankung und in Familien mit DBC in 21,6% der Fälle.

Magenkarzinome kamen in Familien mit LBC in 7,2% der Fälle und bei DBC in 2,3% der Fälle vor. Auch gab es mehr Verwandte mit einem Mammakarzinom in Familien mit LBC als in Familien mit DBC, 18% versus 8,1%. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen LBC und dem Magenkarzinom gezeigt werden (Chikman et al., 2015).

In 30-60% aller Fälle von LBC können Mutationen oder Deletionen in *CDH1* im Tumor nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu werden im DBC nur in seltenen Fällen Veränderungen in *CDH1* nachgewiesen. Dies konnte auch an unserem Patientenkollektiv gezeigt werden. 55% aller an LBC erkrankten Frauen hatten eine Veränderung in *CDH1* aber nur 27% der an DBC erkrankten Frauen (Stuebs et al., 2017). Klinische Unterschiede zwischen *CDH1* positiven und negativen Fällen von LBC konnten nicht identifiziert werden. Nur bei Patientinnen, die zusätzlich zur *CDH1*-Mutation eine Veränderung im ERBB2-Gen haben, konnte eine schlechtere Prognose gefunden werden (Ping et al., 2016).

### **5.4 Patientin mit *CDH1*-Veränderung**

Eine gesunde Patientin, die zum Zeitpunkt der Untersuchung 45 Jahre alt war, trug die Veränderung c.2512 A>G; p. Ser838Gly (ClinVar hereditary cancer-predisposing syndrome RCV000115857.5 und neoplasm of ovary RCV00013020.4). Die Patientin ist negativ auf

Mutationen in BRCA1 getestet. Allerdings ist in der Familie der Mutter eine BRCA1-Mutation bekannt.

Ihre Mutter ist mit 29 Jahren an einem Ovarial- und mit 40 Jahren an einem Mammakarzinom erkrankt. Ihre Cousine mütterlicherseits ist ebenfalls mit 39 Jahren an einem Ovarial- und mit 41 Jahren an einem Mammakarzinom erkrankt. Auch die Tante mütterlicherseits ist mit 48 Jahren an einem Ovarialkarzinom erkrankt. Die Großmutter mütterlicherseits ist mit 60 Jahren an einem Mammakarzinom und in unbekanntem Alter an einem Magen- oder Unterleibskarzinom erkrankt.

Die Veränderung in *CDH1* wird bei ClinVar als somatische Mutation bei Ovarialkarzinomen angegeben und als „pathologisch“ eingestuft. Diese Mutation wird auch im Zusammenhang mit einem diffusen Magenkarzinom beschrieben. Die Pathogenität ist für ein Magenkarzinom aber nicht klar definiert und wird eher als „likely benign“ eingestuft. Da jedoch keine funktionellen Analysen vorliegen und somit eine Auswirkung auf die Funktion weder belegt noch ausgeschlossen werden kann, wird diese Veränderung gemäß der 5 Klassen-Einteilung als Class 3 (Variante unklarer Signifikanz) geführt (Plon et al., 2008). Ein weiterer Hinweis auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen Veränderung und Erkrankung können auch Segregationsanalysen und daraus folgenden Segregationen der Veränderung mit den Erkrankungen geben. LOH-Analysen an den Tumoren mit dem Verlust des Wildtyp-Allels können darüber hinaus weitere Aufschlüsse geben.

In der Familie sind drei Frauen an einem Ovarialkarzinom erkrankt. Zwei von ihnen in sehr jungem Alter unter 40J. Für die Ovarial und Mammakarzinome ist wahrscheinlich die BRCA1 Mutation verantwortlich.

Es ist fraglich, ob die Veränderung c.2512 A>G; p. Ser838Gly wirklich, wie in ClinVar beschrieben, einen pathologischen Einfluss auf die Entstehung von Ovarialkarzinomen hat, da sie nach 1994 (Risinger et al., 1994) nicht wieder in dem Zusammenhang beschrieben worden ist.

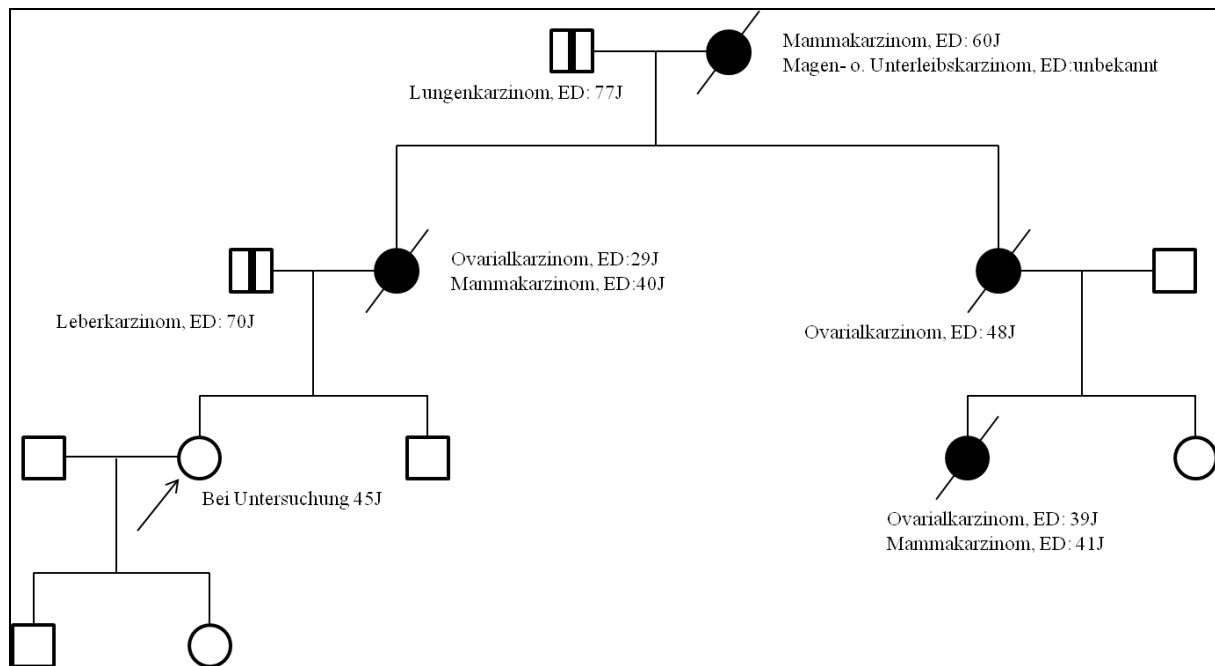


Abbildung 6: Stammbaum der Mutationsträgerin: c.2512 A>G

## 5.5 Das Risiko an einem Karzinom zu erkranken in Trägern von *CDH1*-Mutationen

Oben wurde die Penetranz für das diffuse Magenkarzinom als 100% angegeben. Streng genommen handelt es sich dabei um die histopathologische Penetranz. Das Risiko, einen klinisch apparenten Tumor zu entwickeln, ist etwas geringer (Benusiglio et al., 2013). Das kumulative Risiko eines Trägers einer *CDH1*-Mutation ein diffuses Magenkarzinom bis zum Alter von 80 Jahren zu entwickeln, beträgt 70% für einen Mann und 56% für eine Frau. Für eine Frau mit einer *CDH1*-Mutation wird das Risiko einen LBC zu bekommen auf 42% geschätzt (van der Post et al., 2015, Hansford et al., 2015). Deshalb sollten bei Patienten, bei denen eine Mutation von *CDH1* vorkommen könnte, eine intensive Anamnese durchgeführt werden. Ist nach der Anamnese eine Mutation wahrscheinlich, sollte nach gründlicher humangenetischer Beratung und im Einvernehmen mit dem Patienten eine Testung auf eine mögliche Mutation erfolgen. Der Patient muss über die Folgen einer positiven Testung aufgeklärt werden. Positiv getestete Patienten müssen dann auch über die oben genannten Risiken und Präventivmaßnahmen aufgeklärt werden. Dazu gehört unter anderem die prophylaktische Gastektomie.

Auch wenn nicht in allen Familien mit HDGC ein lobuläres Mammakarzinom beschrieben wird, ist das Risiko für Frauen daran zu erkranken erhöht. Diese Frauen sollten sich einer intensiven Vorsorgeuntersuchung unterziehen. Verschiedene Studien zeigen, dass die

Sensitivität von Mammographien für LBC stark schwankt. Deshalb sollte zusätzlich eine Magnetresonanztomographie (MRT) gemacht werden. Trägerinnen einer *CDH1*-Mutation über 30 sollten sich jährlich einer MRT-Kontrolle unterziehen (Fitzgerald et al., 2010, van der Post et al., 2015).

## 5.6 Fazit

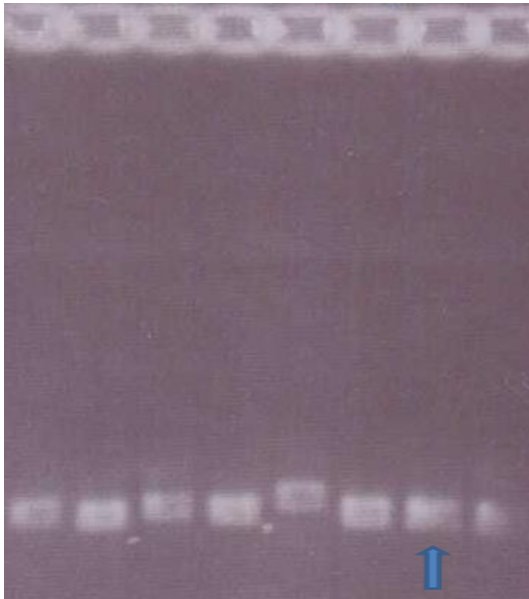
Die Wahrscheinlichkeit, Träger einer Mutation in *CDH1* zu sein, ist nur in Familien mit Syndrom des hereditären diffusen Magenkarzinoms erhöht. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass in Familien, die nicht die Kriterien für das hereditäre diffuse Magenkarzinom erfüllen, keine gehäuften Mutationsraten in *CDH1* vorkommen. Eine detaillierte und gründliche Anamnese ist entscheidend, um keine potentiellen Träger von Mutationen zu übersehen. In der Anamnese sollten grundsätzlich folgende Kriterien erfasst sein: Anzahl der an Karzinomen erkrankten Familienmitglieder, Tumorentität, Verwandtschaftsgrad, Erkrankungsalter und ob eine genetische Testung durchgeführt wurde. Sollte sich durch die Anamnese kein klares Bild ergeben oder aber die familiäre Situation unklar sein, dann ist in begründeten Fällen eine gezielte genetische Testung durchzuführen, um den möglichen letalen Folgen von Brust- und Magenkarzinomen vorzubeugen. Aufgrund der fallenden Kosten und der schnellen Testergebnisse ist es sinnvoll, *CDH1* in der Paneldiagnostik mit zu untersuchen.

## 5.7 Methodenkritik

Im zweiten Amplicon von Exon 13 wurde bei sechs verschiedenen Proben von Patienten in der DHPLC ein Doppelpeak mit Verdacht auf eine Veränderung des Genoms festgestellt. Allerdings konnte keine Veränderung in der Sanger-Sequenzierung nachgewiesen werden. Für den Forward-Strang ließ sich der komplette kodierende Bereich des Exons in der Sanger-Sequenzierung auswerten. Der Reverse-Strang konnte nicht ausgewertet werden, da die Sanger Sequenzierung für alle sechs Proben nicht funktioniert hat.

Da ausschließlich die Reverse Sequenzierung nicht funktioniert hat, liegt die Vermutung nahe, dass der Reverse-Primer nicht richtig bindet und es zu fehlerhaften PCR-Produkten kommt. Dadurch würde es in der DHPLC zu Abbruchphänomenen und artifiziellen Heteroduplices kommen. Allerdings war im Agarosegel für das zweite Amplicon von Exon 13 nur eine Bande darstellbar (s. Abbildung 7). Da die Bande allerdings vergleichsweise breit

ist, besteht die Möglichkeit, dass sich darin PCR-Produkte verbergen, die nur sehr geringe Längendifferenzen aufweisen.



**Abbildung 7: Agarosegel : PCR-Produkt vom zweiten Amplicon von Exon 13 (s. Pfeil)**

In der Literatur wird die Sensitivität und Spezifität der DHPLC mit fast 100% angegeben (Arnold et al., 1999). Daher ist eine Veränderung im kodierenden Bereich sehr wahrscheinlich. Im Forward-Strang des Amplicons von Exon 13 konnte eine Veränderung im Exon ausgeschlossen werden. Möglicherweise handelt es sich bei den Veränderungen um intronische Polymorphismen, die im äußersten Rand des Amplicons liegen und nicht von der Sanger-Sequenzierung erfasst werden, ohne Auswirkungen auf die Aminosäurestruktur des E-cadherin zu haben. Auch die hohe Anzahl von sechs Veränderungen spricht gegen eine mutagene Veränderung, da die Anzahl an Mutationen in *CDH1* insgesamt unter 1% liegt (Euhus, 2014).

Auch bei einem Amplicon in Exon 1 gibt es in der DHPLC bei einer Patientin einen Doppelpeak, ohne dass sich in der Sanger-Sequenzierung eine Veränderung im Exon nachweisen lässt. Sowohl im Forward-Strang als auch im Reverse-Strang sind keine Veränderungen nachweisbar. Auch hier handelt es sich wahrscheinlich um eine intronische Veränderung, die von der DHPLC erfasst wird, aber nicht in der Sanger-Sequenzierung.

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob Mutationen in *CDHI* in Familien mit erblichem Brust- und Magenkarzinomen vermehrt vorkommen und sich für den Einsatz in einer Paneldiagnostik eignen.

Mutationen in *CDHI* sind vor allem mit DBC und LBC, der zweithäufigsten Tumorentität (10-15% aller Mammakarzinome) nach DBC (Sagara et al., 2015), vergesellschaftet. Besonders häufig werden *CDHI*-Mutationen in Familien, die die Kriterien eines HDGC erfüllen, gefunden (Benusiglio et al., 2013).

In dieser Studie wurden 97 negativ auf BRCA1/2 getestete Patienten mit erblichem Brust- und Eierstockkarzinomen auf *CDHI*-Mutationen untersucht. Die DNA wurde mittels PCR vervielfältigt und auf Mutationen mittels DHPLC voruntersucht. Auffällige DHPLC-Befunde wurden sequenziert und auf Veränderungen untersucht.

In dieser Studie konnten in 55% aller Patienten mit LBC und 27% aller Patienten mit DBC genomische Veränderungen gefunden werden, zwei davon verändern die Aminosäurestruktur. Keine dieser Veränderungen war pathologisch. In der Literatur wird beschrieben, dass in 30-60% aller Fälle von LBC somatische Mutationen gefunden wurden. Dies könnte ein Hinweis für einen modifizierenden Einfluss auf die spätere Tumorentstehung sein. Unsere Ergebnisse stimmen mit den in der Literatur publizierten überein. Kraus et al. hat in einer Studie mit 581 Probanden nur eine *CDHI* Veränderung gefunden. Diese wurde als seltener Polymorphismus eingeschätzt (Kraus et al., 2017).

Testungen auf *CDHI* sind vor allem in Familien mit HDGC notwendig. Außerdem sollten Frauen mit einer positiven Familienanamnese von LBC für eine genetische Testung in Betracht gezogen werden. Auch wenn *CDHI*-Mutationen in Familien, die die Kriterien für das diffuse Magenkarzinomsyndrom nicht erfüllen, selten gefunden werden, sollte *CDHI* Bestandteil der Paneldiagnostik sein. Übersehende Mutationen in *CDHI* können zu einer frühen, aber vermeidbaren Mortalität führen. Mehr genetische Informationen können zur Beratung von gesunden Frauen, aber auch zum therapeutischen Management benutzt werden. Aufgrund fallender Kosten können in einer Paneltestung neben Hochrisikogenen auch Gene mit einem moderaten Risiko getestet werden. Dadurch wird mit einem überschaubaren Mehraufwand deutlich mehr an Informationen gewonnen, zum Vorteil der Patienten.

## 7 Literaturverzeichnis

2000. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. Anglian Breast Cancer Study Group. *Br J Cancer*, 83, 1301-8.
2001. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet*, 358, 1389-99.
2012. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol*, 13, 1141-51.
- APURI, S. 2017. Neoadjuvant and Adjuvant Therapies for Breast Cancer. *South Med J*, 110, 638-642.
- ARNOLD, N., GROSS, E., SCHWARZ-BOEGER, U., PFISTERER, J., JONAT, W. & KIECHLE, M. 1999. A highly sensitive, fast, and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers. *Hum Mutat*, 14, 333-9.
- ARPINO, G., BARDOU, V. J., CLARK, G. M. & ELLEDGE, R. M. 2004. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res*, 6, R149-56.
- BARTKOVA, J., TOMMISKA, J., OPLUSTILOVA, L., AALTONEN, K., TAMMINEN, A., HEIKKINEN, T., MISTRIK, M., AITOMAKI, K., BLOMQVIST, C., HEIKKILA, P., LUKAS, J., NEVANLINNA, H. & BARTEK, J. 2008. Aberrations of the MRE11-RAD50-NBS1 DNA damage sensor complex in human breast cancer: MRE11 as a candidate familial cancer-predisposing gene. *Mol Oncol*, 2, 296-316.
- BENUSIGLIO, P. R., MALKA, D., ROULEAU, E., DE PAUW, A., BUECHER, B., NOGUES, C., FOURME, E., COLAS, C., COULET, F., WARCOIN, M., GRANDJOUAN, S., SEZEUR, A., LAURENT-PUIG, P., MOLIÈRE, D., TLEMSANI, C., DI MARIA, M., BYRDE, V., DELALOGUE, S., BLAYAU, M. & CARON, O. 2013. CDH1 germline mutations and the hereditary diffuse gastric and lobular breast cancer syndrome: a multicentre study. *J Med Genet*, 50, 486-9.
- BERX, G., CLETON-JANSEN, A. M., NOLLET, F., DE LEEUW, W. J., VAN DE VIJVER, M., CORNELISSE, C. & VAN ROY, F. 1995. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *Embo j*, 14, 6107-15.
- BERX, G., CLETON-JANSEN, A. M., STRUMANE, K., DE LEEUW, W. J., NOLLET, F., VAN ROY, F. & CORNELISSE, C. 1996. E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene*, 13, 1919-25.
- BUCHHOLZ, T. A., HUNT, K. K., WHITMAN, G. J., SAHIN, A. A. & HORTOBAGYI, G. N. 2003. Neoadjuvant chemotherapy for breast carcinoma: multidisciplinary considerations of benefits and risks. *Cancer*, 98, 1150-60.
- CHEON, J. Y., MOZERSKY, J. & COOK-DEEGAN, R. 2014. Variants of uncertain significance in BRCA: a harbinger of ethical and policy issues to come? *Genome Med*, 6, 121.
- CHIKMAN, B., DAVIDSON, T., KAIS, H., JEROUKHIMOV, I., LESHNO, A., SANDBANK, J., HALEVY, A. & LAVY, R. 2015. Is there an association between invasive lobular carcinoma of the breast and a family history of gastric cancer? *Fam Cancer*.
- CHRISTGEN, M. & DERKSEN, P. W. 2015. Lobular breast cancer: molecular basis, mouse and cellular models. *Breast Cancer Res*, 17, 16.
- CHRISTGEN, M., STEINEMANN, D., KUHNLE, E., LANGER, F., GLUZ, O., HARBECK, N. & KREIPE, H. 2016. Lobular breast cancer: Clinical, molecular and morphological characteristics. *Pathol Res Pract*, 212, 583-97.
- CLAVEL-CHAPELON, F. & GERBER, M. 2002. Reproductive factors and breast cancer risk. Do they differ according to age at diagnosis? *Breast Cancer Res Treat*, 72, 107-15.
- COLEMAN, W. B. & ANDERS, C. K. 2017. Discerning Clinical Responses in Breast Cancer Based On Molecular Signatures. *Am J Pathol*, 187, 2199-2207.
- DESMEDT, C., ZOPPOLI, G., GUNDEM, G., PRUNERI, G., LARSIMONT, D., FORNILI, M., FUMAGALLI, D., BROWN, D., ROTHE, F., VINCENT, D., KHEDDOUMI, N., ROUAS, G., MAJJAJ, S., BROHEE, S., VAN LOO, P., MAISONNEUVE, P., SALGADO, R., VAN BRUSSEL, T., LAMBRECHTS, D., BOSE, R., METZGER, O., GALANT, C., BERTUCCI, F., PICCART-GEHBART, M., VIALE, G., BIGANZOLI, E.,

- CAMPBELL, P. J. & SOTIRIOU, C. 2016. Genomic Characterization of Primary Invasive Lobular Breast Cancer. *J Clin Oncol*, 34, 1872-81.
- DIEDRICH, H., JONAT, SCHULTZE-MOSGAU, SCHNEIDER, WEISS 2007. Gynäkologie und Geburtshilfe 2. Auflage; Springer Verlag.
- DOSSUS, L. & BENUSIGLIO, P. R. 2015. Lobular breast cancer: incidence and genetic and non-genetic risk factors. *Breast Cancer Res*, 17, 37.
- DRAGANESCU, M. & CARMOCAN, C. 2017. Hormone Therapy in Breast Cancer. *Chirurgia (Bucur)*, 112, 413-417.
- ECCLES, B. K., COPSON, E., MAISHMAN, T., ABRAHAM, J. E. & ECCLES, D. M. 2015a. Understanding of BRCA VUS genetic results by breast cancer specialists. *BMC Cancer*, 15, 936.
- ECCLES, D. M., MITCHELL, G., MONTEIRO, A. N., SCHMUTZLER, R., COUCH, F. J., SPURDLE, A. B. & GOMEZ-GARCIA, E. B. 2015b. BRCA1 and BRCA2 genetic testing-pitfalls and recommendations for managing variants of uncertain clinical significance. *Ann Oncol*, 26, 2057-65.
- ECONOMOPOULOU, P., DIMITRIADIS, G. & PSYRRI, A. 2015. Beyond BRCA: new hereditary breast cancer susceptibility genes. *Cancer Treat Rev*, 41, 1-8.
- EUHUS, D. 2014. Genetic testing today. *Ann Surg Oncol*, 21, 3209-15.
- FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., PARKIN, D. M., FORMAN, D. & BRAY, F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136, E359-86.
- FITZGERALD, R. C., HARDWICK, R., HUNTSMAN, D., CARNEIRO, F., GUILFORD, P., BLAIR, V., CHUNG, D. C., NORTON, J., RAGUNATH, K., VAN KRIEKEN, J. H., DWERRYHOUSE, S. & CALDAS, C. 2010. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *J Med Genet*, 47, 436-44.
- FORD, D., EASTON, D. F., STRATTON, M., NAROD, S., GOLDFAR, D., DEVILEE, P., BISHOP, D. T., WEBER, B., LENOIR, G., CHANG-CLAUDE, J., SOBOLE, H., TEARE, M. D., STRUEWING, J., ARASON, A., SCHERNECK, S., PETO, J., REBBECK, T. R., TONIN, P., NEUHAUSEN, S., BARKARDOTTIR, R., EYFJORD, J., LYNCH, H., PONDER, B. A., GAYTHER, S. A., ZELADA-HEDMAN, M. & ET AL. 1998. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*, 62, 676-89.
- FUJITA, H., LENNERZ, J. K., CHUNG, D. C., PATEL, D., DESHPANDE, V., YOON, S. S. & LAUWERS, G. Y. 2012. Endoscopic surveillance of patients with hereditary diffuse gastric cancer: biopsy recommendations after topographic distribution of cancer foci in a series of 10 CDH1-mutated gastrectomies. *Am J Surg Pathol*, 36, 1709-17.
- GENTILINI, O., BOTTERI, E., LEONARDI, M. C., ROTMENSZ, N., VILA, J., PERADZE, N., THOMAZINI, M. V., JERECZEK, B. A., GALIMBERTI, V., LUINI, A., VERONESI, P. & ORECCHIA, R. 2017. Ipsilateral axillary recurrence after breast conservative surgery: The protective effect of whole breast radiotherapy. *Radiother Oncol*, 122, 37-44.
- GUILFORD, P., HOPKINS, J., HARRAWAY, J., MCLEOD, M., MCLEOD, N., HARAWIRA, P., TAITE, H., SCOULAR, R., MILLER, A. & REEVE, A. E. 1998. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*, 392, 402-5.
- HANSFORD, S., KAURAH, P., LI-CHANG, H., WOO, M., SENZ, J., PINHEIRO, H., SCHRADER, K. A., SCHAEFFER, D. F., SHUMANSKY, K., ZOGOPOULOS, G., SANTOS, T. A., CLARO, I., CARVALHO, J., NIELSEN, C., PADILLA, S., LUM, A., TALHOUK, A., BAKER-LANGE, K., RICHARDSON, S., LEWIS, I., LINDOR, N. M., PENNELL, E., MACMILLAN, A., FERNANDEZ, B., KELLER, G., LYNCH, H., SHAH, S. P., GUILFORD, P., GALLINGER, S., CORSO, G., ROVIELLO, F., CALDAS, C., OLIVEIRA, C., PHAROAH, P. D. & HUNTSMAN, D. G. 2015. Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. *JAMA Oncol*, 1, 23-32.
- HEBBARD, P. C., MACMILLAN, A., HUNTSMAN, D., KAURAH, P., CARNEIRO, F., WEN, X., KWAN, A., BOONE, D., BURSEY, F., GREEN, J., FERNANDEZ, B., FONTAINE, D. & WIRTZFELD, D. A. 2009. Prophylactic total gastrectomy (PTG) for hereditary diffuse gastric cancer (HDGC): the Newfoundland experience with 23 patients. *Ann Surg Oncol*, 16, 1890-5.



- HILAKIVI-CLARKE, L., DE ASSIS, S. & WARRI, A. 2013. Exposures to synthetic estrogens at different times during the life, and their effect on breast cancer risk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 18, 25-42.
- HUYNH, J. M. & LAUKAITIS, C. M. 2016. Panel testing reveals nonsense and missense CDH1 mutations in families without hereditary diffuse gastric cancer. *Mol Genet Genomic Med*, 4, 232-6.
- JAMDADE, V. S., SETHI, N., MUNDHE, N. A., KUMAR, P., LAHKAR, M. & SINHA, N. 2015. Therapeutic Targets of Triple Negative Breast Cancer: A Review. *Br J Pharmacol*.
- KRAUS, C., HOYER, J., VASILEIOU, G., WUNDERLE, M., LUX, M. P., FASCHING, P. A., KRUMBIEGEL, M., UEBE, S., REUTER, M., BECKMANN, M. W. & REIS, A. 2017. Gene panel sequencing in familial breast/ovarian cancer patients identifies multiple novel mutations also in genes others than BRCA1/2. *Int J Cancer*, 140, 95-102.
- LANGER, I., GULLER, U., VIEHL, C. T., MOCH, H., WIGHT, E., HARDER, F., OERTLI, D. & ZUBER, M. 2009. Axillary lymph node dissection for sentinel lymph node micrometastases may be safely omitted in early-stage breast cancer patients: long-term outcomes of a prospective study. *Ann Surg Oncol*, 16, 3366-74.
- LEK, M., KARCZEWSKI, K. J., MINIKEL, E. V., SAMOCHA, K. E., BANKS, E., FENNELL, T., O'DONNELL-LURIA, A. H., WARE, J. S., HILL, A. J., CUMMINGS, B. B., TUKIAINEN, T., BIRNBAUM, D. P., KOSMICKI, J. A., DUNCAN, L. E., ESTRADA, K., ZHAO, F., ZOU, J., PIERCE-HOFFMAN, E., BERGHOUT, J., COOPER, D. N., DEFLAUX, N., DEPRISTO, M., DO, R., FLANNICK, J., FROMER, M., GAUTHIER, L., GOLDSTEIN, J., GUPTA, N., HOWRIGAN, D., KIEZUN, A., KURKI, M. I., MOONSHINE, A. L., NATARAJAN, P., OROZCO, L., PELOSO, G. M., POPLIN, R., RIVAS, M. A., RUANO-RUBIO, V., ROSE, S. A., RUDERFER, D. M., SHAKIR, K., STENSON, P. D., STEVENS, C., THOMAS, B. P., TIAO, G., TUSIE-LUNA, M. T., WEISBURD, B., WON, H. H., YU, D., ALTSHULER, D. M., ARDISSINO, D., BOEHNKE, M., DANESH, J., DONNELLY, S., ELOSUA, R., FLOREZ, J. C., GABRIEL, S. B., GETZ, G., GLATT, S. J., HULTMAN, C. M., KATHIRESAN, S., LAAKSO, M., MCCARROLL, S., MCCARTHY, M. I., MCGOVERN, D., MCPHERSON, R., NEALE, B. M., PALOTIE, A., PURCELL, S. M., SALEHEEN, D., SCHARF, J. M., SKLAR, P., SULLIVAN, P. F., TUOMILEHTO, J., TSUANG, M. T., WATKINS, H. C., WILSON, J. G., DALY, M. J., MACARTHUR, D. G. & EXOME AGGREGATION, C. 2016. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 536, 285-91.
- LI, C. I., DALING, J. R., MALONE, K. E., BERNSTEIN, L., MARCHBANKS, P. A., LIFF, J. M., STROM, B. L., SIMON, M. S., PRESS, M. F., MCDONALD, J. A., URSIN, G., BURKMAN, R. T., DEAPEN, D. & SPIRTAS, R. 2006. Relationship between established breast cancer risk factors and risk of seven different histologic types of invasive breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15, 946-54.
- LI, C. I., URIBE, D. J. & DALING, J. R. 2005. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer*, 93, 1046-52.
- LICHTENSTEIN, P., HOLM, N. V., VERKASALO, P. K., ILIADOU, A., KAPRIO, J., KOSKENVUO, M., PUKKALA, E., SKYTTE, A. & HEMMINKI, K. 2000. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*, 343, 78-85.
- MANFRED STAUBER, T. W. 2007. Duale Reihe: Gynäkologie und Geburtshilfe; 3. Auflage; Thieme Verlag.
- MAVADDAT, N., BARROWDALE, D., ANDRULIS, I. L., DOMCHEK, S. M., ECCLES, D., NEVANLINNA, H., RAMUS, S. J., SPURDLE, A., ROBSON, M., SHERMAN, M., MULLIGAN, A. M., COUCH, F. J., ENGEL, C., MCGUFFOG, L., HEALEY, S., SINILNIKOVA, O. M., SOUTHEY, M. C., TERRY, M. B., GOLDGAR, D., O'MALLEY, F., JOHN, E. M., JANAVICIUS, R., TIHOMIROVA, L., HANSEN, T. V., NIELSEN, F. C., OSORIO, A., STAVROPOULOU, A., BENITEZ, J., MANOUKIAN, S., PEISSEL, B., BARILE, M., VOLORIO, S., PASINI, B., DOLCETTI, R., PUTIGNANO, A. L., OTTINI, L., RADICE, P., HAMANN, U., RASHID, M. U., HOGERVORST, F. B., KRIEGE, M., VAN DER LUIJT, R. B., PEOCK, S., FROST, D., EVANS, D. G., BREWER, C., WALKER, L., ROGERS, M. T., SIDE, L. E., HOUGHTON, C., WEAVER, J., GODWIN, A. K., SCHMUTZLER, R. K., WAPPENSCHMIDT, B., MEINDL, A., KAST, K., ARNOLD, N., NIEDERACHER, D., SUTTER, C., DEISSLER, H., GADZICKI, D., PREISLER-ADAMS,

- S., VARON-MATEEVA, R., SCHONBUCHNER, I., GEVENSLEBEN, H., STOPPA-LYONNET, D., BELOTTI, M., BARJHOUX, L., ISAACS, C., PESHKIN, B. N., CALDES, T., DE LA HOYA, M., CANADAS, C., HEIKKINEN, T., HEIKKILA, P., AITOMAKI, K., BLANCO, I., LAZARO, C., BRUNET, J., AGNARSSON, B. A., ARASON, A., BARKARDOTTIR, R. B., DUMONT, M., SIMARD, J., MONTAGNA, M., AGATA, S., D'ANDREA, E., YAN, M., FOX, S., REBBECK, T. R., RUBINSTEIN, W., TUNG, N., GARBER, J. E., WANG, X., FREDERICKSEN, Z., PANKRATZ, V. S., LINDOR, N. M., SZABO, C., OFFIT, K., SAKR, R., et al. 2012. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 21, 134-47.
- MAVADDAT, N., PEOCK, S., FROST, D., ELLIS, S., PLATTE, R., FINEBERG, E., EVANS, D. G., IZATT, L., EELES, R. A., ADLARD, J., DAVIDSON, R., ECCLES, D., COLE, T., COOK, J., BREWER, C., TISCHKOWITZ, M., DOUGLAS, F., HODGSON, S., WALKER, L., PORTEOUS, M. E., MORRISON, P. J., SIDE, L. E., KENNEDY, M. J., HOUGHTON, C., DONALDSON, A., ROGERS, M. T., DORKINS, H., MIEDZYBRODZKA, Z., GREGORY, H., EASON, J., BARWELL, J., MCCANN, E., MURRAY, A., ANTONIOU, A. C. & EASTON, D. F. 2013. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst*, 105, 812-22.
- MCCART REED, A. E., KUTASOVIC, J. R., LAKHANI, S. R. & SIMPSON, P. T. 2015. Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and 'omics. *Breast Cancer Res*, 17, 12.
- MCCREADY, D., HOLLOWAY, C., SHELLEY, W., DOWN, N., ROBINSON, P., SINCLAIR, S. & MIRSKY, D. 2005. Surgical management of early stage invasive breast cancer: a practice guideline. *Can J Surg*, 48, 185-94.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, 263-273.
- O'SHAUGHNESSY, J. 2005. Extending survival with chemotherapy in metastatic breast cancer. *Oncologist*, 10 Suppl 3, 20-9.
- OEFFNER, P. J. & HUBER, C. G. 2002. A decade of high-resolution liquid chromatography of nucleic acids on styrene-divinylbenzene copolymers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 782, 27-55.
- PETRIDIS, C., SHINOMIYA, I., KOHUT, K., GORMAN, P., CANEPPELE, M., SHAH, V., TROY, M., PINDER, S. E., HANBY, A., TOMLINSON, I., TREMBATH, R. C., ROYLANCE, R., SIMPSON, M. A. & SAWYER, E. J. 2014. Germline CDH1 mutations in bilateral lobular carcinoma in situ. *Br J Cancer*, 110, 1053-7.
- PING, Z., SIEGAL, G. P., HARADA, S., ELTOUM, I. E., YOUSSEF, M., SHEN, T., HE, J., HUANG, Y., CHEN, D., LI, Y., BLAND, K. I., CHANG, H. R. & SHEN, D. 2016. ERBB2 mutation is associated with a worse prognosis in patients with CDH1 altered invasive lobular cancer of the breast. *Oncotarget*, 7, 80655-80663.
- PLON, S. E., ECCLES, D. M., EASTON, D., FOULKES, W. D., GENUARDI, M., GREENBLATT, M. S., HOGERVORST, F. B., HOOGERBRUGGE, N., SPURDLE, A. B. & TAVTIGIAN, S. V. 2008. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat*, 29, 1282-91.
- RAKHA, E. A., EL-SAYED, M. E., POWE, D. G., GREEN, A. R., HABASHY, H., GRAINGE, M. J., ROBERTSON, J. F., BLAMEY, R., GEE, J., NICHOLSON, R. I., LEE, A. H. & ELLIS, I. O. 2008. Invasive lobular carcinoma of the breast: response to hormonal therapy and outcomes. *Eur J Cancer*, 44, 73-83.
- RAKHA, E. A., PATEL, A., POWE, D. G., BENHASOUNA, A., GREEN, A. R., LAMBROS, M. B., REIS-FILHO, J. S. & ELLIS, I. O. 2010. Clinical and biological significance of E-cadherin protein expression in invasive lobular carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol*, 34, 1472-9.
- RISINGER, J. I., BERCHUCK, A., KOHLER, M. F. & BOYD, J. 1994. Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nat Genet*, 7, 98-102.
- RIVERA, S., LOUVEL, G., RIVIN DEL CAMPO, E., BOROS, A., OUESLATI, H. & DEUTSCH, E. 2015. [Prophylactic axillary radiotherapy for breast cancer]. *Cancer Radiother*.

- ROBERT-KOCH INSTITUT, K. G., CORNELIA HEITMANN, KATRIN JAHNSEN, CORNELIA LANGE 2005. Heft 25: Brustkrebs; Gesundheitsberichterstattung des Bundes.
- ROBERT KOCH-INSTITUT, D. P. K. E. A. 2013. "Krebs in Deutschland 2009/2010": Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 9. Ausgabe. Berlin.
- ROCHE, H. & VAHDAT, L. T. 2011. Treatment of metastatic breast cancer: second line and beyond. *Ann Oncol*, 22, 1000-10.
- ROGERS, W. M., DOBO, E., NORTON, J. A., VAN DAM, J., JEFFREY, R. B., HUNTSMAN, D. G., KINGHAM, K., CHUN, N., FORD, J. M. & LONGACRE, T. A. 2008. Risk-reducing total gastrectomy for germline mutations in E-cadherin (CDH1): pathologic findings with clinical implications. *Am J Surg Pathol*, 32, 799-809.
- ROSSOUW, J. E., ANDERSON, G. L., PRENTICE, R. L., LACROIX, A. Z., KOOPERBERG, C., STEFANICK, M. L., JACKSON, R. D., BERESFORD, S. A., HOWARD, B. V., JOHNSON, K. C., KOTCHEN, J. M. & OCKENE, J. 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*, 288, 321-33.
- SAGARA, Y., BARRY, W. T., MALLORY, M. A., VAZ-LUIS, I., AYDOGAN, F., BROCK, J. E., WINER, E. P., GOLSHAN, M. & METZGER-FILHO, O. 2015. Surgical Options and Locoregional Recurrence in Patients Diagnosed with Invasive Lobular Carcinoma of the Breast. *Ann Surg Oncol*.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SCHMITT, J., MISI, L. & DOYLE, R. A. J. 2000. <Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Insertion & Deletion Detection on the WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis System Transgenomic Inc. Application Note 112..pdf>.
- STUEBS, F., HEIDEMANN, S., CALIEBE, A., MUNDHENKE, C. & ARNOLD, N. 2017. CDH1 mutation screen in a BRCA1/2-negative familial breast-/ovarian cancer cohort. *Arch Gynecol Obstet*.
- TAKEICHI, M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 251, 1451-5.
- VAN DER POST, R. S., VOGELAAR, I. P., CARNEIRO, F., GUILFORD, P., HUNTSMAN, D., HOOGERBRUGGE, N., CALDAS, C., SCHREIBER, K. E., HARDWICK, R. H., AUSEMS, M. G., BARDAM, L., BENUSIGLIO, P. R., BISSELING, T. M., BLAIR, V., BLEIKER, E., BOUSSIOUTAS, A., CATS, A., COIT, D., DEGREGORIO, L., FIGUEIREDO, J., FORD, J. M., HEIJKOOP, E., HERMENS, R., HUMAR, B., KAURAH, P., KELLER, G., LAI, J., LIGTENBERG, M. J., O'DONOVAN, M., OLIVEIRA, C., PINHEIRO, H., RAGUNATH, K., RASENBERG, E., RICHARDSON, S., ROVIELLO, F., SCHACKERT, H., SERUCA, R., TAYLOR, A., TER HUURNE, A., TISCHKOWITZ, M., JOE, S. T., VAN DIJCK, B., VAN GRIEKEN, N. C., VAN HILLEGERSBERG, R., VAN SANDICK, J. W., VEHOFF, R., VAN KRIEKEN, J. H. & FITZGERALD, R. C. 2015. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. *J Med Genet*, 52, 361-74.
- XIAO, W. & OEFNER, P. J. 2001. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat*, 17, 439-74.
- XIE, Z. M., LI, L. S., LAQUET, C., PENAULT-LLORCA, F., UHRHAMMER, N., XIE, X. M. & BIGNON, Y. J. 2011. Germline mutations of the E-cadherin gene in families with inherited invasive lobular breast carcinoma but no diffuse gastric cancer. *Cancer*, 117, 3112-7.

## 8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Arnold, der mich sehr gut durch die Herausforderungen der Laborarbeit geführt hat. Er hat mich bei allen Fragestellungen und Problemen theoretisch und praktisch zeitnah unterstützt.

Ein großer Dank gilt außerdem Frau Dr. Simone Heidemann, die mich bei der Erstellung der Publikation „*CDH1* mutation screen in a *BRCA1/2*-negative familial breast-/ovarian cancer cohort“ unterstützt hat.

Ich möchte mich ganz besonders beim gesamten Team des onkologischen Labors bedanken. Sie haben mich immer mit praktischen Tipps und einer unerschöpflichen Geduld unterstützt.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Professor Dr. Nicolai Maass für die Möglichkeit, in dem onkologischen Labor seiner Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe meine Forschungsarbeiten durchführen zu können und meine Dissertation schreiben zu dürfen.

Auch bei meiner Mutter möchte ich mich für ihre ausgiebige Geduld und Unterstützung bedanken.

## **9 Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name:	Frederik Alexander Stübs
Geburtsdatum:	21.03.1991
Geburtsort:	Kappeln
Anschrift:	Henkestraße 114, 91052 Erlangen
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

### **Schulbildung**

1997 - 2001	Grundschule, Habertwedt
2001 - 2007	Gymnasium, Klaus-Harms Schule, Kappeln
2007 - 2009	Wadham School, Crewkerne, Großbritannien (A-level als Hochschulzugangsberechtigung in Deutschland anerkannt)

### **Wehrdienst**

01.10.2009 - 30.06.2010	Wehrdienst bei der Flugabwehrraketengruppe 26 in Husum
-------------------------	-----------------------------------------------------------

### **Praktikum**

01.07.2010 - 30.09.2010	Pflegedienstpraktikum, Ostseeklinik Damp
-------------------------	------------------------------------------

### **Studium**

10.2010 – 11.2016	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts- Universität zu Kiel
-------------------	-----------------------------------------------------------------------------

### **Famulaturen**

04.03.2013 - 31.03.2013	Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus Kiel GmbH
15.07.2013 - 31.08.2013	Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
09.09.2013 - 22.09.2013	Internistische Aufnahmestation, Städtisches Krankenhaus Kiel GmbH
23.09.2013 - 06.10.2013	MARE Klinikum GmbH & Co.KG
18.08.2014 - 31.08.2014	Neurochirurgie, Universitätsklinikum Schleswig- Holstein

01.09.2014 - 14.09.2014	Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Schleswig- Holstein
15.09.2014 - 05.10.2014	Hausarztpraxis, Dr. med. Köhnlein
06.10.2014 - 19.10.2014	Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Schleswig- Holstein

### **Praktisches Jahr**

2015 - 2016	1. Tertial: Gynäkologie, Universitätsklinikum Erlangen 2. Tertial: Chirurgie, Kantonsspital Bruderholz, Schweiz 3. Tertial: Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus, Kiel
-------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### **Approbation**

14.11.2016	Approbation als Arzt
------------	----------------------

### **Beruf**

01.02.2017	Assistenzarzt an der Universitätsfrauenklinik Erlangen
07/2017	Studienzentrumsleiter der HPV-INT-CX Studie

### **Extracurriculare Aktivitäten während des Studiums**

01.05.2013 - 31.10.2014	Studentische Hilfskraft im Blutentnahmedienst des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein
SS 2013 - SS 2015	Tutor des Kurses „Einführung in die klinische Medizin“
WS 2014/15	Studentischer Mitarbeiter am Physiologischen Institut Kiel
10/2014 - 10/2015	Studentische Nachtwache im HNO-Kopfzentrum Kiel
2011 - 2016	Mitglied der Fachschaft Medizin
01.07.2012 - 30.6.2013	stellvertretendes Mitglied im Konvent der Med. Fakultät
01.07.2013 - 30.6.2014	Mitglied im Konvent der Med. Fakultät
01.07.2014 - 30.6.2015	Mitglied im Konvent der Med. Fakultät

Veröffentlichungen: 09/2017

Frederik Stuebs; Simone Heidemann, Almuth Caliebe; Christoph Mundhenke; Norbert Arnold. „CDH1-mutation screen in a BRCA1/2 negative familial breast-/ovarian cancer cohort. Arch Gynecol Obstet

**Versicherung an Eides statt**

Die vorliegende Dissertation habe ich selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient.

Kiel, den 07.12.2017

Frederik Stübs